# 显微镜深度学习路线图

Giovanni Volpe[1], Carolina Wählby[2], Lei Tian[3,4], Michael Hecht[5], Artur Yakimovich[5,6,7,8], Kristina Monakhova[9], Laura Waller[9], Ivo F. Sbalzarini[10,11], Christopher A. Metzler[12], Mingyang Xie[12], Kevin Zhang[12], Isaac C.D. Lenton[13,14], Halina Rubinsztein-Dunlop[14,15], Daniel Brunner[16], Bijie Bai[17], Aydogan Ozcan[17], Daniel Midtvedt[1], Hao Wang[3], Nataša Sladoje[18], Joakim Lindblad[18], Jason T. Smith[19,20], Marien Ochoa[19, 21], Margarida Barroso[22], Xavier Intes[19], Tong Qiu[23], Li-Yu Yu[23], Sixian You[23], Yongtao Liu[24], Maxim A. Ziatdinov[24,25], Sergei V. Kalinin[26], Arlo Sheridan[27], Uri Manor[27], Elias Nehme[28,29], Ofri Goldenberg[29], Yoav Shechtman[29], Henrik K. Moberg[30], Christoph Langhammer[30], Barbora Špačková[31], Saga Helgadottir[2,32], Benjamin Midtvedt[1], Aykut Argun[1], Tobias Thalheim[33], Frank Cichos[33], Stefano Bo[34,35], Lars Hubatsch[36], Jesus Pineda[1], Carlo Manzo[37], Harshith Bachimanchi[1], Erik Selander[38], Antoni Homs-Corbera[39], Martin Fränzl[33], Kevin de Haan[17], Yair Rivenson[17], Zofia Korczak[1], Caroline Beck

---

[1] 哥德堡大学物理系，瑞典哥德堡 41296 [2] 乌普萨拉大学信息技术系与SciLifeLab，瑞典 [3] 波士顿大学电气与计算机工程系，美国马萨诸塞州波士顿 02215 [4] 波士顿大学生物医学工程系，美国马萨诸塞州波士顿 02215 [5] 先进系统理解中心（CASUS），亥姆霍兹德累斯顿-罗森多夫研究中心（HZDR），德国格尔利茨。[6] 膀胱感染与免疫研究组（BIIG），伦敦大学学院医学部肾脏医学系，皇家自由医院校区，英国伦敦 [7] 生命科学人工智能社区利益公司，英国多塞特 [8] 罗氏制药国际信息学，罗氏诊断有限公司，德国曼海姆 [9] 加州大学伯克利分校电气工程与计算机科学系，美国 [10] 德累斯顿工业大学计算机科学学院，德国德累斯顿 [11] 马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所，德累斯顿系统生物学中心，德国德累斯顿 [12] 马里兰大学帕克分校，美国 [13] 奥地利科学技术研究所（ISTA），奥地利克洛斯特新堡 3400 [14] 昆士兰大学数学与物理学院，澳大利亚布里斯班 4072 [15] 澳大利亚研究理事会工程量子系统卓越中心，昆士兰大学，澳大利亚布里斯班 4072 [16] P. M. Duffieux 光学系，FEMTO-ST 研究所，弗朗什-孔泰大学，法国国家科学研究中心 UMR 6174，法国贝桑松 [17] 加利福尼亚大学洛杉矶分校电气与计算机工程系，美国加利福尼亚州洛杉矶 [18] 乌普萨拉大学信息技术系，瑞典 [19] 伦斯勒理工学院生物医学工程系，美国纽约州特洛伊 12180。[20] Elephas，美国威斯康星州麦迪逊 53705，Erdman Pl. 1号 [21] 威斯康星大学麦迪逊分校医学物理系，美国威斯康星州麦迪逊 53705 [22] 奥尔巴尼医学院分子与细胞生理学系，美国纽约州奥尔巴尼 12208。[23] 麻省理工学院电子学研究实验室、电气工程与计算机科学，美国马萨诸塞州波士顿 [24] 橡树岭国家实验室纳米相材料科学中心，美国田纳西州橡树岭 37830 [25] 橡树岭国家实验室计算科学与工程部，美国田纳西州橡树岭 37830 [26] 田纳西大学材料科学与工程系，美国田纳西州诺克斯维尔 37996 [27] 索尔克生物研究所，美国加利福尼亚州拉霍亚 [28] Technion – IIT 电气与计算机工程系，以色列 [29] Technion – IIT 生物医学工程系及 Lorry I. Lokey生命科学与工程跨学科中心，以色列 [30] 查尔姆斯理工大学物理系；瑞典哥德堡 [31] 捷克科学院物理研究所光学与生物物理系统系；捷克共和国布拉格 [32] 斯德哥尔摩大学生物化学与生物物理系，瑞典 [33] 莱比锡大学彼得·德拜软物质物理研究所分子纳米光子学组，德国莱比锡 Linnéstraße 5，04103 [34] 马克斯·普朗克复杂系统物理研究所，德国德累斯顿 Nöthnitzer Straße 38，DE-01187 [35] 伦敦国王学院物理系，英国伦敦 WC2R 2LS [36] 马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所，德国德累斯顿 Pfotenhauerstraße 108，01307 [37] 维克大学—加泰罗尼亚中央大学科学、技术与工程学院（UVic-UCC），西班牙维克 [38] 哥德堡大学海洋科学系，瑞典 [39] Cherry Biotech SAS 研发部，法国巴黎

Adiels[1], Mite Mijalkov[40], Dániel Veréb[40], Yu-Wei Chang[1], Joana B. Pereira[40], Damian Matuszewski[41],Gustaf Kylberg[42], Ida-Maria Sintorn[42,43], Juan C. Caicedo[44], Beth A Cimini[44], Muyinatu A. Lediju Bell[45],Bruno M. Saraiva[46], Guillaume Jacquemet[47,48,49,50], Ricardo Henriques[46, 51], Wei Ouyang[52], Trang Le[53],Estibaliz Gómez-de-Mariscal[46], Daniel Sage[54], Arrate Muñoz-Barrutia[55,56], Ebba Josefson Lindqvist[57],Johanna Bergman[57]

**客座编辑：**
Giovanni Volpe：
giovanni.volpe@physics.gu.seCarolina Wählby：
carolina.wahlby@it.uu.se Lei Tian： leitian@bu.edu

## 摘要

通过数字成像，显微镜成像已从主要用于观察微观和纳米尺度生命现象的工具，发展为一种分辨率和通量不断提升的定量工具。人工智能、深度神经网络和机器学习都是一些小众术语，用于描述过去十年间在基于显微镜成像的研究中发挥了关键作用的计算方法。本路线图由多位杰出研究人员共同撰写，探讨了机器学习应用于显微图像数据的若干方面，旨在通过提升图像质量、实现对象的自动化检测、分割、分类和追踪，以及高效融合多种成像模态的信息，获取科学知识。我们希望帮助读者概览关键进展，并了解机器学习在显微镜成像中的可能性与局限性。本文将吸引物理科学和生命科学领域广泛的跨学科读者。

[40] 临床神经科学系，卡罗林斯卡学院，斯德哥尔摩，瑞典[41] 信息技术系，乌普萨拉大学，瑞典 [42] Vironova AB，瑞典[43] 信息技术系，乌普萨拉大学，瑞典 [44] 麻省理工学院与哈佛大学博德研究所，美国马萨诸塞州波士顿 [45] 约翰·霍普金斯大学，美国[46] 古尔本基安科学研究所，葡萄牙奥埃拉什[47] Turku Bioscience Centre，图尔库大学与奥博学术大学，芬兰图尔库 [48] 理工学院，细胞生物学，奥博学术大学，芬兰图尔库 [49] Turku Bioimaging，图尔库大学与奥博学术大学，FI- 20520 芬兰图尔库 [50] InFLAMES 研究旗舰中心，奥博学术大学，FI- 20520，芬兰图尔库 [51] MRC 分子细胞生物学实验室，伦敦大学学院，英国伦敦[52] 生命科学实验室，应用物理系，KTH 皇家理工学院，171 65 瑞典斯德哥尔摩[53] 生物工程系，斯坦福大学，美国加利福尼亚州斯坦福 94305 [54] 生物医学成像组与 EPFL 成像中心，洛桑联邦理工学院（EPFL），瑞士洛桑 [55] 生物工程系，马德里卡洛斯三世大学，西班牙莱加内斯[56] 格雷戈里奥·马拉尼翁卫生研究所，西班牙马德里[57] AI Sweden，瑞典哥德堡

**TOOLS 与算法**

1 — 逆问题的稳定性 2 — 基于物理的学习 3 — 从大型三维图像中学习可解释的物理模型 4 — 即插即用学习型计算成像 5 — 加速光力模拟 6 — 用于全光计算和成像的光学网络

**ENHANCED 显微镜成像**

7 — 定量显微术 8 — 计算相位显微术 9 — 多模态显微镜图像配准 10 — 荧光寿命成像 11 — 多模态非线性显微镜 12 — 自动化扫描探针显微术 13 — 扫描显微图像复原

**SINGLE 分子**

14 — 单分子定位 15 — 纳流体散射显微术

**PARTICLE 追踪与轨迹分析**

16 — 粒子追踪 17 — 单次拍摄自监督目标检测 18 — 力场校准 19 — 扩散表征 20 — 使用 MAGIK 进行微观运动表征 21 — 单分子生物动力学定量分析 22 – 浮游生物生命轨迹

**BIOLOGICAL 与BIOMEDICAL 应用**

23 — 微生理系统 24 — 自学习热流体学 25 — 数字病理学 26 — 虚拟染色 27 — 使用虚拟染色进行细胞表型判定 28 — 神经影像分析 29 — 生物分析与诊断透射电子显微镜 30 — 高内涵高通量筛选 31 — 超声与光声成像

**SOFTWARE 平台与软件包**

32 — 推动公平获取深度学习解决方案 33 — 深度学习应用部署 34 — DeepTrack 2 35 — DeepImageJ 36 — 激发创新的黑客马拉松

# 1 — 逆问题的稳定性

Michael Hecht[1], Artur Yakimovich[1-4]

1. 先进系统理解中心（CASUS），亥姆霍兹德累斯顿-罗森多夫研究中心（HZDR），格尔利茨，德国。2. 膀胱感染与免疫研究组（BIIG），肾脏医学系，医学部，伦敦大学学院，皇家自由医院校区，伦敦，英国。3. 生命科学人工智能社区利益公司，多塞特，英国。4. 罗氏制药国际信息学，罗氏诊断有限公司，曼海姆，德国

## 状态

数百年来，研究人员和爱好者一直为亲眼见证微观世界的奇妙而着迷。这种着迷，以及通过微观世界中的现象解释宏观尺度上发生之事的能力，促使人们开发出大量技术，用于观察、探测和重建微小对象，其尺度从小型动物一直延伸到原子（**图1.1**）。这些技术包括多种功能性（以分子染料标记）和无标记的光学显微成像模式，例如明场、落射荧光、共聚焦荧光和光片显微镜（参见文献 [1]）。为突破光衍射极限的限制，人们开发了电子显微镜（EM）技术，例如扫描电子显微镜和透射电子显微镜（分别为 SEM 和 TEM），但这类技术的样品制备步骤相对复杂。为了尽量减少样品制备伪影，并在天然状态下观察生物实体，人们进而开发了冷冻电子显微镜技术 [2]。电子显微镜对我们理解微观世界的贡献无论如何强调都不为过，但样品制备极其复杂、设备昂贵，近年来推动了超分辨率显微镜（SRM）的发展。其他值得关注且正在兴起的技术还包括 X射线显微镜、活体延时显微镜、全息显微术，以及利用相互作用力绘制微观世界的原子力显微术（AFM）。

值得注意的是，过去半个世纪以来显微技术蓬勃发展的一个共同促进因素是数字显微成像。数字显微成像源于显微摄影，它摆脱了必须将显微图像投射到显微镜观察者视网膜上的限制，并实现了对图像的数字化采集和描述，也因此使显微镜成像成为一门定量学科。数字化不仅便于记录和存储显微镜数据，还改进了图像处理、去噪和直接模式识别。进而，这为计算机视觉（CV）算法（包括机器学习（ML）和深度学习（DL）算法）铺平了道路，推动显微镜成像取得进一步进展。

## 当前与未来的挑战

鉴于显微镜技术的种类极其繁多（**图1.1**），显微镜数据集显然具有极强的领域特异性。这给机器学习和深度学习研究带来了重大挑战，因为对于绝大多数计算机视觉算法而言，域外推理绝非易事。这一点在成像模态差异很大时尤为明显，例如电子显微镜与共聚焦荧光显微镜。此外，在 ImageNet 上效果良好的传统图像增强方法，用于显微镜数据集时效果却很差。厂商特定的数据格式显然不利于数据集的协调统一与可迁移性。许多情况下，使用特定厂商硬件获取的图像训练出的模型，根本无法泛化到其他厂商的设备。最后，尽管显微图像数据正逐渐变得触手可及，但高质量的标注，

尤其是那些共识度较高的数据，仍然难以获取。所有这些挑战都使显微镜数据的机器学习和深度学习策略处于低数据机制中，从而限制了研究人员可选用的算法。

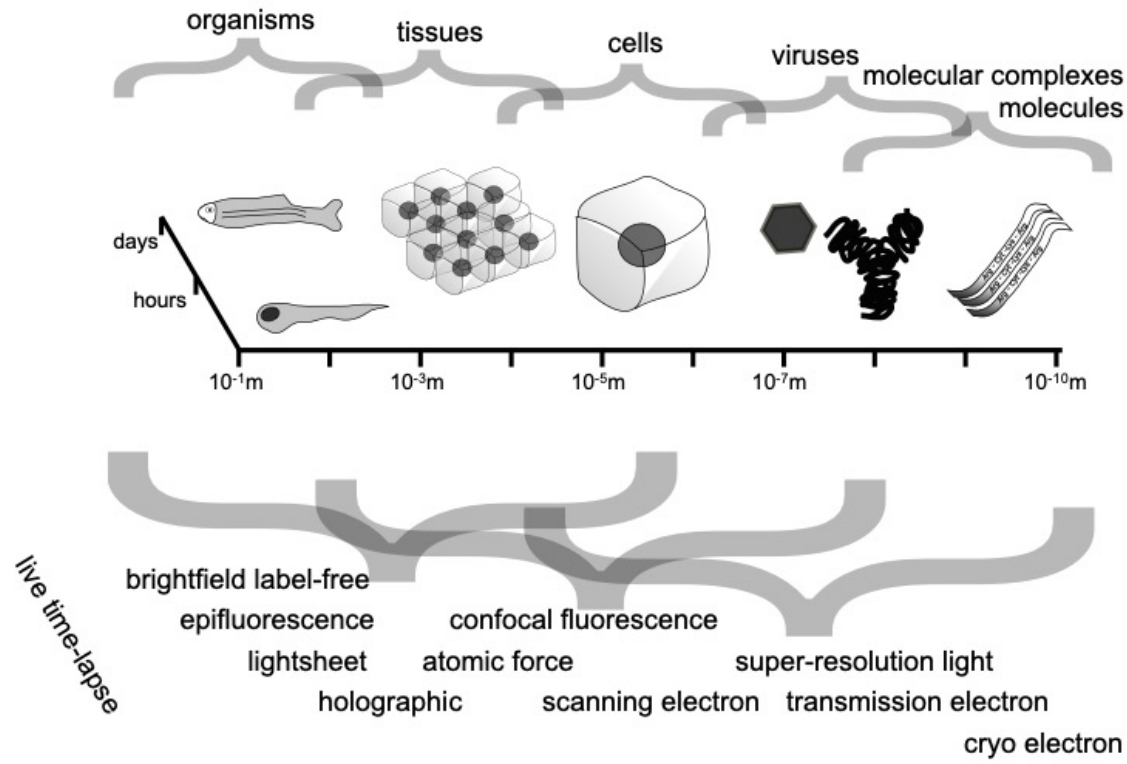


**图 1.1 显微技术及其应用的时空谱图**。此处，部分方法关键词 a re 对齐与一个比例范围相对应，这是一个近似值。

**应对挑战的科学技术进展**

显微镜成像机器学习方法论的最新进展已明确证明，成熟的机器学习/深度学习算法有能力应对前述挑战及其组合[3]，，并为图像处理和分析提供解决方案。迄今为止，这些进展已成功用于解决显微镜成像中的机器学习任务，例如图像重建与超分辨率、分类与生成、去噪、分割、细胞追踪和特征选择[3–7]。然而，成熟算法倾向于应用于上述低数据机制，这促使Hansen等人[9] 通过提出以下问题来探究这些技术：“此类算法应用于科学研究时有多可靠？”以及“基于人工智能的算法是否存在无法避免的阿喀琉斯之踵：不稳定性？”

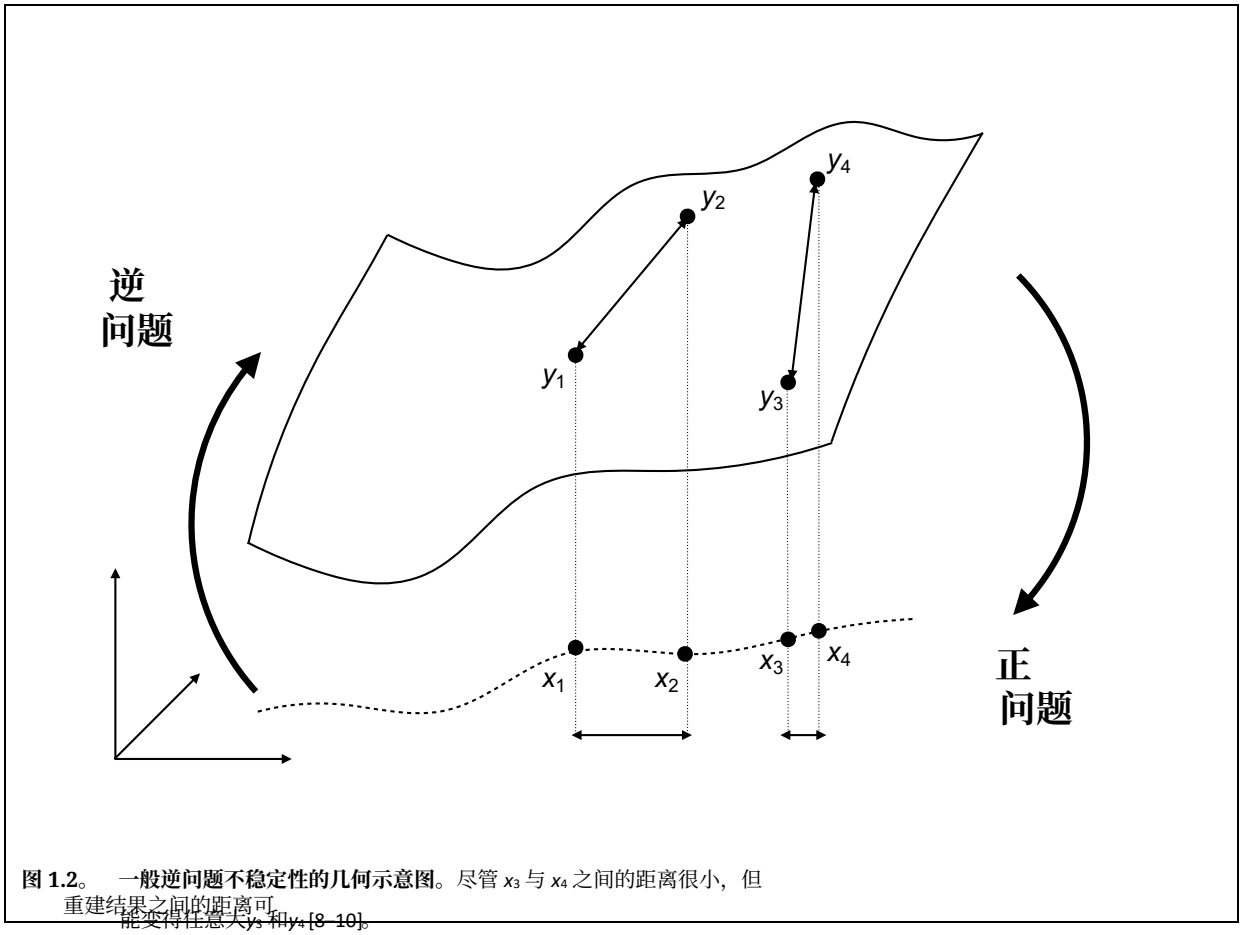


**图 1.2**。 **一般逆问题不稳定性的几何示意图**。尽管 $x_3$ 与 $x_4$ 之间的距离很小，但重建结果之间的距离可能变得任意大($y_3$ 和$y_4$ [8–10]。

从数学角度来看，上述任务旨在求解非线性逆问题。然而，普遍不稳定性定理 [8–10] 证明了一般逆问题从本质上是不稳定的。**图 1.2**对此进行了说明。这里，前向模型是将二维曲面沿 x 方向投影到一条曲线上。前向过程中信息的丢失（零空间）可能导致彼此任意接近的实例产生任意大的重建距离。换言之：可观测量*x*的微小噪声扰动可能导致*y*的重建结果发生巨大变化。

虽然经典主成分分析（PCA）能够为线性逆问题提供稳定解，但此处存在的非线性要求开发能够抵抗不稳定性现象的新策略。近期，针对分类和去噪任务鲁棒性的研究提出了对抗式再训练、基于生成对抗网络的去噪，以及显式控制核（零空间）的方法，以避免这一问题。这些结果在文献 [10] 中进行了讨论，并通过新的回归技术加以补充。此外，当前研究现状表明，在遵循并纳入数学洞见和所提供的机器学习技术后，可以确保与此处相关的一般实例类逆问题的稳定性。总而言之，这表明采用更新且更稳定的机器学习/深度学习算法，可能有助于避免显微镜成像中机器学习/深度学习模型固有的不稳定性。此外，这些方法还可能促进生成算法的发展，从而缓解低数据情境并改善泛化能力。

**总结**

显微技术和机器学习算法的最新进展相辅相成，推动着新一代生物医学成像方法的发展。然而，显微数据集的数据稀缺和领域特异性，是这种协同作用面临的一大障碍。此外，我们发现了一个

阻碍因素，使其难以达到科学推理所要求的高可靠性。关键在于，必须确保用于解决显微图像处理任务中出现的（逆）问题的机器学习方法具有稳定性。尽管丰富低数据机制或许可以减少不稳定性的发生，但我们指出，实践中普遍存在的目标会妨碍这一策略。认识到这些数学局限性，则能通过纳入相关技术来提供摆脱这一困境的途径，从而在实践中获得抵御不稳定现象所需的能力。

**致谢**
本研究部分经费由高级系统理解中心（*CASUS*）提供。该中心由德国联邦教育与研究部（*BMBF*）和萨克森州科学、文化与旅游部（*SMWK*）资助，资金来自税收，依据萨克森州议会批准的预算拨付。

**参考文献**
1. R. Witte、V. Andriasyan、F. Georgi、A. Yakimovich 和 U. F. Greber，“病毒光学显微镜概论”，《病毒》10 (4)，202，2018年。2. G. Weissenberger、R. J. M. Henderikx 和 P. J. Peters，“理解冷冻电子显微镜样品制备中那些看不见的幕后工作”，《自然·方法》18(5)，463–471，2021年。3. E. Galimov 和 A. Yakimovich，“用于定位秀丽隐杆线虫寿命和运动性形态预测因子的串联分割-分类方法”，Aging 14(4)，1665–1677，2022年。4. O. Ronneberger、P. Fischer 和 T. Brox，“U-Net：用于生物医学图像分割的卷积网络”，载于《医学图像计算与计算机辅助干预——MICCAI 2015》，2015年，第234–241页。5. U. Schmidt、M. Weigert、C. Broaddus 和 G. Myers，“使用星凸多边形进行细胞检测”，载于《医学图像计算与计算机辅助干预——MICCAI 2018》，2018年，第265–273页。6. M. Weigert 等，“内容感知图像复原：突破荧光显微镜的极限”，《自然·方法》15(12)，1090–1097，2018年。7. E. Nehme、L. E. Weiss、T. Michaeli 和 Y. Shechtman，“Deep-STORM：利用深度学习实现单分子超分辨率显微成像”，Optica 5(4)，458-464，2018年。8. N. M. Gottschling、V. Antun、B. Adcock 和 A. C. Hansen，“棘手的核：为什么深度学习用于逆问题通常不稳定”，arXiv [cs.LG], 2020年1月5日。[在线]。网址：http://arxiv.org/abs/2001.01258 9. V. Antun、F. Renna、C. Poon、B. Adcock 和 A. C. Hansen，“深度学习在图像重建中的不稳定性及人工智能的潜在代价”，美国国家科学院院刊117(48)，30088–30095，2020 年。10. S.B. Jain 、 Z. Shao 、 S.K.T. Veettil 和 M.Hecht，“针对机器学习去噪器的对抗攻击及其防御方法”，新兴人工智能主题（ETAI），美国加利福尼亚州圣迭戈，~~SPIE 会议论文集 12204，122~~0402，2022年。DOI：10.1117/12.2632954

# 2 — 基于物理的学习

Kristina Monakhova[1], Laura Waller[1]

1. 加州大学伯克利分校电气工程与计算机科学系，美国

## 状态

计算成像致力于协同设计成像光学系统与算法，以打造性能更优、功能更强大的成像设备，使其能够观测到二维图像之外的事物。在天文学领域，这种协同设计促成了人类首次拍摄到黑洞图像。在摄影领域，计算成像让我们能够使用极其小巧的相机拍摄高动态范围（HDR）和人像模式照片。本文将聚焦于显微镜成像领域，计算成像已应用于超分辨率、单次曝光三维成像和相位显微成像，并展现出巨大潜力：通过让我们从更多维度观测更小、更快、不可见的事物，推动新的科学发现。

对于计算显微镜而言，光学设计和算法设计都至关重要。多年来，光学设计主要依赖启发式方法，例如镜头锐度以及人工设计的性能指标；然而，结合重建算法或成像任务来看，这些设计未必是最优的。同样，算法设计也主要依赖优化方法，由数据保真项和人工挑选的先验构成。这些算法往往运行缓慢，需要经过多次迭代才能收敛；所依赖的先验未必适合具体应用，而且只要光学模型存在误差，就可能出现模型失配。近年来，人们开始采用基于深度学习的方法，这些方法能够更紧密地将光学设计与算法结合起来[1]，并通过数据驱动方法改进算法[2]。

基于深度学习的重建算法利用可训练的神经网络和大型数据集，学习更好的成像逆问题求解方法。这些方法在将成像逆问题的求解速度提升多个数量级、改善图像质量 [3], 以及为欠定问题（例如压缩式单次曝光三维显微成像）提供更好的先验方面，展现出巨大潜力 [4]。通过使用可微的基于物理的光学模型，可以将光学设计表示为神经网络的第一层，并与重建算法进行端到端优化 [1,5] （**图2.1**）。这打破了传统光学设计的范式，为光学设计开启了新时代：显微镜中的每个元件都针对特定算法和高层任务进行专门设计，而非针对锐度指标进行设计。

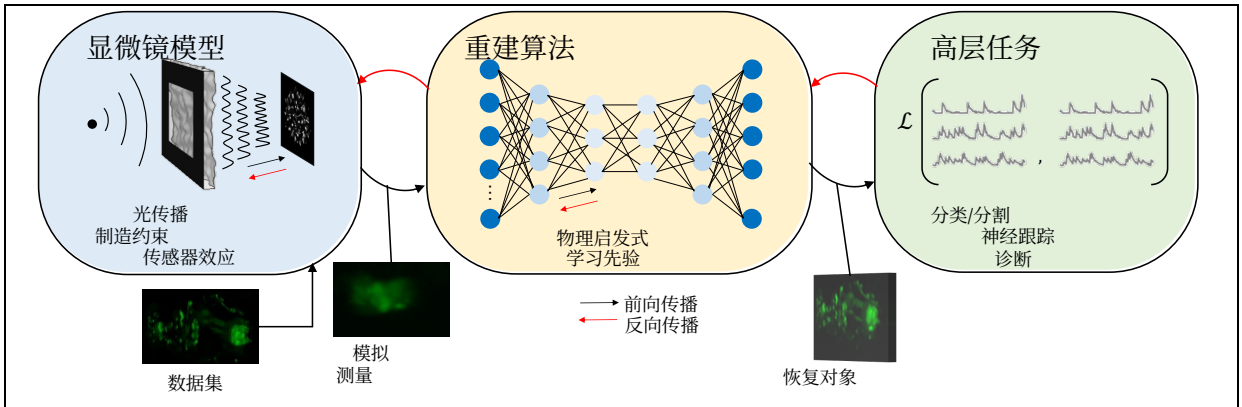


**图2.1. 计算显微成像的端到端设计**。传统上，光学硬件和逆算法都是通过启发式方法设计的。借助可微光学，光学系统可表示为神经网络的第一层，并与逆算法联合学习，还可选择加入高层任务。这样一来，便可针对给定任务直接优化光学系统（此处展示的是利用三维单次曝光显微镜进行神经活动追踪），而非以获得最佳图像质量为优化目标。

**当前与未来的挑战**

在计算显微成像中使用基于深度学习的技术，往往需要在训练阶段使用大型定制数据集。例如，要为高光谱显微术学习最佳的光学“编码器”和“解码器”，就需要一个大型高分辨率高光谱图像数据集用于训练。对于某些成像模态或任务，这类数据集并不存在、规模过小、分辨率不足，或者难以获取。在机器学习的其他领域，例如自动驾驶车辆研究，高质量的基于物理的模拟器已成功用于合成逼真的传感器数据。同样，为显微镜成像构建准确的基于物理的模拟器（例如，对复杂光相互作用、多重散射和复杂生物样本进行建模），可以让计算显微镜主要使用合成数据集进行训练，从而无需真实的实验数据集。另一种方法是，无监督学习有望利用神经网络的结构，而无需训练数据 [6,7]。

将光学物理领域知识与深度学习相结合，有望提高基于深度学习的重建结果的可解释性和性能[3,5,8]。现成的网络（如卷积神经网络）并不了解光学物理，因此在用于求解逆问题时，必须从头学习这些信息，因而需要大量数据集和漫长的训练时间。相比之下，基于物理的网络利用可微物理模型融入光学领域知识，从而构建效率更高的物理信息网络。这些物理信息网络还可用于校准光学系统，例如学习如何合成和表征真实的相机噪声[8]，，或学习像差和非线性等其他效应。这有助于为特定光学系统合成真实的数据集，也可能将这些网络纳入重建流程，作为更准确的非线性前向模型。

最后，计算成像方法擅长打造针对特定高层任务（例如细胞计数、疾病诊断）进行优化的任务专用显微镜。对于许多科学和临床应用而言，做出判断并不需要高分辨率图像——图像中的某些特征（例如偏振、波长、相位）可能比其他特征更重要。通过端到端设计，使光学系统与重建和高层任务共同学习，有望打造更优、更快、更小、功能更强的显微镜，专门用于做出判断，或从现实世界中提取最有用的信息。

**应对挑战的科学技术进展**

尽管深度学习在计算成像领域前景广阔，但鲁棒性和保证仍是重大挑战。无法信赖的显微镜，不适用于科学和临床应用。对于基于机器学习的重建算法，难以判断算法何时有效，以及何时可以信赖重建结果。网络结构和所用训练数据会影响结果，并可能引入与信号无法区分的伪影。关于不确定性量化 [9]和鲁棒性的深度学习理论研究，有望解决其中一些挑战。此外，将信号处理应用于深度学习的基础研究，或许能把经典信号处理（如压缩感知）中的一些数学保证带入深度学习领域[10]。为基于机器学习的算法提供保证并量化不确定性，对于推动其在科学与医学计算显微镜中的广泛应用至关重要。

## 总结

利用基于深度学习的方法来学习更优的光学设计和算法，从根本上改变了显微镜的设计方式，有助于突破观测能力的极限，同时还有望实现更小、更便宜、更紧凑的设备。尽管这一方向蕴含许多令人振奋的可能性，但仍有不少科学挑战亟待解决。尚待攻克的问题包括：如何使学习得到的光学设计和算法具备可解释性、如何提高鲁棒性、如何量化不确定性，以及如何获得高质量数据集。将特定领域的知识和已知物理规律融入神经网络，有望帮助应对其中一些挑战。展望未来，机器学习理论学家、光学物理学家和显微镜研究人员之间的跨学科合作研究，有望进一步应对这些挑战，并开启一个新时代，推动打造能力更强、由机器学习设计的计算显微镜。


## 致谢

本研究得到了戴维和露西尔·帕卡德基金会以及戈登和贝蒂·摩尔基金会数据驱动发现计划资助项目 *GBMF4562* 的支持。


## 参考文献


1. V. Sitzmann 等，“面向消色差扩展景深和超分辨率成像的光学系统与图像处理端到端优化”，ACM 图形学汇刊（TOG）**37**(4)，1–13，2018年。2. A. Sinha、J. Lee、S. Li 和 G. Barbastathis，“通过深度学习实现无透镜计算成像”，Optica **4**(9)，1117–1125，2017年。3. K. Monakhova、J. Yurtsever、G. Kuo、N. Antipa、K. Yanny 和 L. Waller，“面向实用掩模式无透镜成像的学习型重建”，Optics Express **27**(20)，28075–28090，2019年。4. K. Yanny、K. Monakhova、R. W. Shuai 和 L. Waller，“用于快速空间变化去卷积的深度学习”，Optica **9**(1)，96–99，2022年。5. M. R. Kellman、E. Bostan、N. A. Repina 和 L. Waller，“基于物理的学习设计：用于定量相位成像的优化编码照明”，IEEE计算成像汇刊 **5**(3)，344–353，2019年。6. K. Monakhova、V. Tran、G. Kuo 和 L. Waller，“用于压缩无透镜摄影的未训练网络”，Optics Express **29**(13)，20913–20929，2021年。7. J. Batson 和 L. Royer，“Noise2self：通过自监督实现盲去噪”，载于《国际机器学习会议》，2019年，第524–533页。8. K. Monakhova、S. R. Richter、L. Waller 和 V. Koltun，“星空下起舞：星光环境中的视频去噪”，载于《IEEE/CVF计算机视觉与模式识别会议论文集》，2022年，第16241–16251页。9. M. Abdar 等，“深度学习中的不确定性量化综述：技术、应用与挑战”，《信息融合》**76**，243–297，2021年。10. J. Sulam、V. Papyan、Y. Romano 和 M. Elad，“多层卷积稀疏建模：追踪与字典学习”，IEEE信号处理汇刊**66**(15)，4090–4104，2018年。

# 3 — 从大型三维图像中学习可解释的物理模型

Ivo F. Sbalzarini[1,2]

1. 德累斯顿工业大学，计算机科学学院，德国德累斯顿 2. 马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所，德累斯顿系统生物学中心，德国德累斯顿

## 状态

随着生物学中体积显微成像模式的出现，例如光片显微镜，人们得以在整个发育过程中，以亚细胞分辨率对发育中的组织和胚胎进行成像 [1]。这为我们提供了直接观察的手段，加速了发育生物学的发展，也加深了我们对细胞如何形成组织的理解。然而，这也带来了一个新问题：如何处理这些显微镜以每秒数吉字节的速度生成的太字节级图像数据。一种解决方案是在采集延时图像的同时实时查看，只记录和分析“有趣”的部分。由于图像是三维的，使用虚拟现实（VR）显示设备是最佳方式。*Scenery* [2], 是一个高性能开源平台，开创了沉浸式体积显微成像的新时代。凭借每秒数十亿体素的渲染性能，*Scenery*让虚拟现实显微成像能够在商用硬件上实时运行，即使面对速度最快的显微镜也不例外。这使发育生物学家和神经科学家能够更直观地理解动态组织复杂的时空组织结构。

然而，人们希望将这种直觉形式化为预测性数学模型，并且理想情况下，这些模型应符合物理规律。研究表明，可以从显微成像视频中算法推断出荧光标记分子的时空动力学控制方程，并且该方法能够充分抵御成像噪声，具有鲁棒性 [3] ，同时保证物理一致性 [4]。然而迄今为止，还无法将这些理念应用于先进的体积成像研究所产生的大型三维图像。一种很有前景的方法是采用比像素规则网格更适用的数据结构来表示原始图像。例如，图像的自适应粒子表示（APR）[5], 通过对图像进行自适应重新采样，仅在有助于图像信息表达的点上存储强度值，从而提高图像的信息数据比（**图 3.1**）。自适应采样的概念在信号处理中由来已久，而 APR 则提供了前所未有的精度和最优性保证。此外，它还可直接用于下游图像处理 [5,6], , 支持原生 APR 流水线端到端处理图像，规模最高可达拍字节级，并能在消费级 GPU 上以每秒超过一太字节的速度运行 [6]。

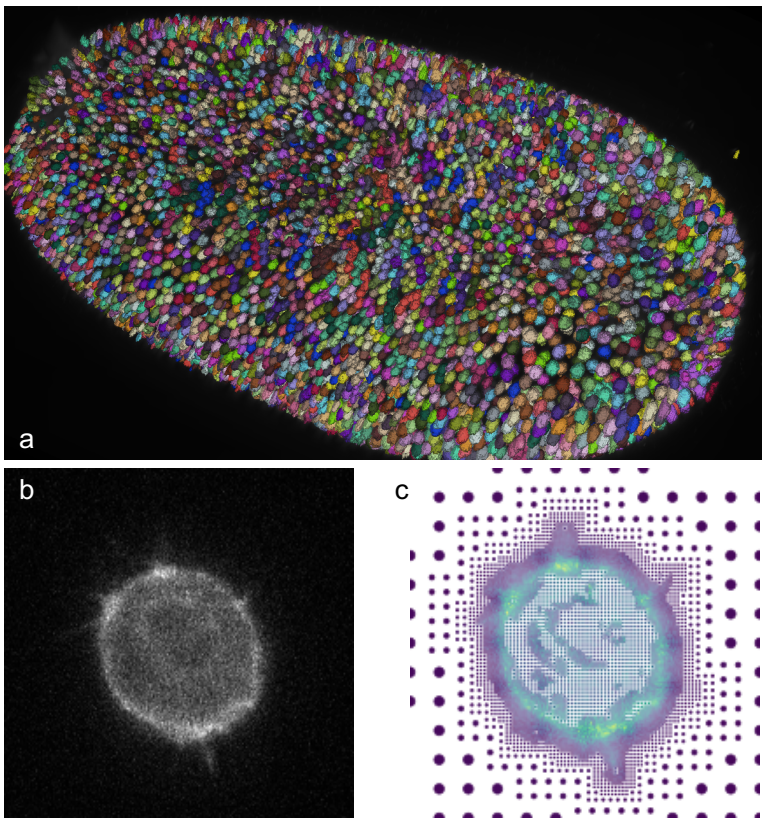


**图 3.1. 自适应粒子表示（APR）**。图像的 APR [5] 以较低的计算成本，对图像进行信息最优采样。**(a)** 经细胞分割的胚胎（原始图像：来自公开的 ISBI细胞追踪挑战赛数据集“Fluo-N3DL-TRIF”；分割与可视化：Joel Jonsson，Sbalzarini实验室）。**(b)** 来自细胞追踪挑战赛的单个 A549细胞。**(c)** (b) 中细胞的 APR粒子（以单个点表示），颜色编码强度信号（APR 与可视化由 Joel Jonsson、Sbalzarini实验室完成）。

**当前与未来的挑战**

当前的显微镜数据集在大型生物成像研究中长期未得到充分利用。样品制备和图像采集不再是瓶颈之后，分析图像并从中获得科学洞见和知识便成了限制研究进展的关键步骤。我们设想，未来人们可以沉浸式体验虚拟现实环境中的体积显微镜数据集，并在其中实时与样品互动，例如通过手势进行光遗传学操作或激光消融，进而训练在环运行的机器学习模块。由此，借助人类增强的算法推断，揭示表征自组织生命物质迷人特性的物理定律和过程将成为可能。尽管实现这一愿景所需的各项要素正逐渐具备，但要将它们整合起来仍是一项挑战。

例如，将 APR [5] 与实时虚拟现实渲染相结合颇具挑战，因为图形处理器上的渲染算法在处理不规则的自适应数据结构时，性能会下降。APR [5] 和基于APR的图像处理 [6] 能够以较低的计算成本（包括存储和处理时间）开展大规模成像研究，并保证达到最优。*Scenery* [2] 支持在虚拟现实和增强现实中对体素图像进行实时沉浸式可视化，但目前还无法对 APR 实现这一点。另一个例子是，尽管学习能够阐释组织形成模式与形态的物理过程的数学模型已成为可能 [3,4], ，但目前尚无法将其扩展至大型数据集。

随着处理大规模数据的能力不断提升，新兴的深度学习架构已被应用于生物成像，包括利用图神经网络从显微成像视频中准确估计生物系统的物理

属性 [7]。另一个例子是 Open-Cell 项目，该项目开发了自监督变分自编码器网络 *Cytoself*，以便从显微图像中推断细胞内介观尺度组织的模型 [8]，这启发了人们思考一种细胞序列到图像生成模型。然而，对这些深度学习模型进行物理和生化解释仍然是一项挑战，或可通过将其与数学模型推断相结合来应对 [3,4]。这可能包括赋予它们空间相互作用的概念 [9]。目前，深度神经网络处理的是图像中对象的形态外观，却不涉及对象彼此之间以及它们相对于参考结构的全局空间排列。空间统计学中一些如今已成经典的概念 [9]，可以在数据驱动框架中重新诠释，从而推动理解迈向新的高度。

**应对挑战的科学技术进展**

要实现这样一个愿景，仍需科学与技术方面的进步：整合沉浸式可视化、信息自适应图像表示和机器学习，从大规模三维图像数据中推断出可解释的物理模型。明显有待补足之处包括：能够沉浸式渲染信息自适应图像表示（例如在虚拟现实环境中的 APR [5]，），以及开发可直接处理此类自适应图像表示、无需中途转换回像素的卷积神经网络（CNN）。最后，还需要将其与算法相结合，以便从图像中提取物理场（例如流动和形变的速度场），并利用这些物理场推断出控制数学方程。这些方程应当足够简单，便于从物理角度解释，同时又足以说明视频中观察到的动力学。

这种联系很可能要通过现代机器学习架构来实现，例如 Transformer 网络或图神经网络。理想情况下，同样应直接处理信息自适应图像表示（例如 APR [5]，），以节省时间和电能。由于 APR 以粒子的形式表示图像，而粒子集中在图像中的对象周围，因此它天然适用于图神经网络方法。结合 MAGIK [7]，等方法后，这或许能实现直接从非常大的三维图像中估计宏观物理量。随后，这些估计出的物理量可用于推断所观察到的时空动力学的数学方程模型 [3,4]，从而回溯至生物学机制。

这一推理循环有望促成这样的实验：科学家在虚拟现实环境中通过手势与样品互动，对组织进行消融，直接观察由此引起的回弹和组织重排，并在数秒内获得估计出的组织弹性常数，以及叠加在图像上的模拟结果（**图3.2**）。通过进一步与样品互动或手动修正估计错误，机器学习模型或仿真模型会在主动学习循环中重新训练。一个有趣的问题是，如何向用户可视化机器学习输出的不确定性，以便引导他们关注重点，并促使他们进行能够提供重要信息的额外扰动。最后，要将这些令人振奋的机器学习和生物成像进展带入日常实验室使用，还需要用户友好、易于部署且稳健的软件实现，并支持云计算。

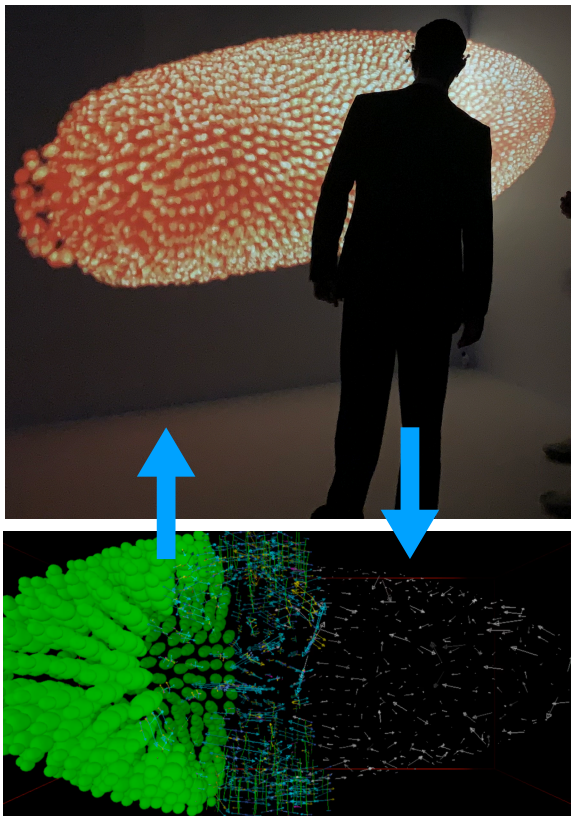

**图3.2。在虚拟现实空间中实现人类-人工智能协作的构想。**[1]实现人（一位科学家用以三维虚拟现实与显微镜中的果蝇胚胎进行实时交互（照片由 Ulrik Günther @CASUS 和 Sbalzarini实验室提供），[2]细胞的仿真模型输出（合成图像）[10]、作用于细胞的力及其速度场（图像经 Vladimir Ulman 和俄斯特拉发技术大学许可使用）。

## 总结

生物活细胞显微镜技术正迎来令人振奋的时代！我们正见证可用分子标记和传感器、显微镜光学系统，以及利用光对活体、正在生长和发生形变的器官与生物体进行定量测量的能力快速进步。挑战在于，确保用于处理、存储和可视化图像的计算工具也能同步发展，并努力更充分地利用图像中包含的信息，例如提供机器学习解决方案，提高从图像数据中推断出具有物理可解释性的机制模型的通量。理想情况下，这一过程可以直接从图像或视频得出方程、模型和知识，绕过迄今为止常见的实例分割和目标跟踪等中间步骤。这不仅能让大型生物成像项目更有洞见，也有望提高准确性并降低资源（能源）消耗。最终，一种全新的生物成像生态系统将应运而生，融合虚拟现实、人工智能和信号理论等方法；几年后，这些方法或许会成为常见的实验室技术，就像单粒子跟踪在过去几年中已变得十分普及一样。


## 致谢

我们感谢 *Vladimir Ulman*（俄斯特拉发技术大学）慷慨提供图*3.2*的下图。我们还特别感谢 *Sbalzarini*实验室的 *Bevan Cheeseman*、*Joel Jonsson*、*Suryanarayana Maddu* 和 *Ulrik Günther*，他们的开创性工作证明了本文所述路线图的可行性。

**参考文献**

1. P. J. Keller、A. D. Schmidt、J. Wittbrodt 和 E. H. Stelzer，“通过扫描光片显微镜重建斑马鱼早期胚胎发育。”《科学》 **322**, 1065–1069, 2008年。2. U. Günther、T. Pietzsch、A. Gupta、K. I. S. Harrington、P. Tomancak、S. Gumhold 和 I. F. Sbalzarini，“scenery：基于 Java 虚拟机的灵活虚拟现实可视化”，载于《*IEEE*可视化会议论文集》（温哥华，不列颠哥伦比亚省，加拿大），第 166–170 页，2019年。3. S. Maddu、B. L. Cheeseman、I. F. Sbalzarini 和 C. L. Müller，“稳定性选择能够从有限的含噪数据中稳健地学习微分方程”，《英国皇家学会学报 *A* 辑》 **478**(2262), 20210916, 2022年。4. S. Maddu、B. L. Cheeseman、C. L. Müller 和 I. F. Sbalzarini，“利用组稀疏性从数据中学习物理一致的微分方程模型”，《物理评论*E*》 **103**(4), 042310, 2021年。5. B. L. Cheeseman、U. Günther、K. Gonciarz、M. Susik 和 I. F. Sbalzarini，“荧光显微图像的自适应粒子表示”，《自然·通讯》 **9**, 5160, 2018 年。6. J. Jonsson 、 B. L. Cheeseman 、 S. Maddu 、 K. Gonciarz 和 I. F. Sbalzarini，“基于图像自适应粒子表示的并行离散卷积”，《*IEEE*图像处理汇刊》 **31**, 4197–4212, 2022年。7. J. Pineda、B. Midtvedt、H. Bachimanchi、S. Noé、D. Midtvedt、G. Volpe 和 C. Manzo，“几何深度学习揭示微观运动的时空指纹。” arXiv 预印本 arXiv:2202.06355, 2022年。8. H. Kobayashi、K. C. Cheveralls、M. D. Leonetti 和 L. A. Royer，“自监督深度学习编码蛋白质亚细胞定位的高分辨率特征。”《自然·方法》 **19**(8), 995-1003, 2022年。9. J. A. Helmuth、G. Paul 和 I. F. Sbalzarini，“超越共定位：从显微图像推断亚细胞结构之间的空间相互作用”，*BMC*生物信息学 **11**, 372, 2010年。10. V. Ulman、Z. Oremus 和 D. Svoboda，“TRAgen：生成活细胞合成延时图像序列的工具”，国际图像分析与处理会议（*ICAP*）, 623–634, 2015年。

# 4 — 即插即用学习型计算成像

Christopher A. Metzler[1], Mingyang Xie[1], Kevin Zhang[1]

1. 马里兰大学帕克分校，美国

## 状态

任何计算成像系统的性能在一定程度上取决于其重建算法的性能。计算成像重建算法的作用是根据$x$ 形式为$y$ 的测量，重建感兴趣的信号／图像

$$y = A(x),$$

其中，$A(x)$表示系统的前向模型。这一数学模型具有普适性，几乎可以表示任何测量过程，从磁共振成像（MRI）中的K空间采样，到傅里叶叠层显微镜中采集带通滤波图像。

传统上，计算成像重建通常通过将成像问题表述为一个优化问题来实现

$$\hat{x} = \text{argmin}_x\, f(x) + r(x),$$

其中，$f(x)$是数据保真项，用于确保$x$ 与测量值$y$保持一致；$r(x)$是正则化惩罚项，用于确保$x$ 符合我们对$x$ 应具有何种结构的先验信念。在特殊情况下，当$f(x) = -\ln p(y|x)$且$r(x) = -\ln p(x)$时，求解上述优化问题可得到$x$的最大后验（MAP）估计。

可以使用任意数量的算法来最小化目标函数$f(x) + r(x)$，例如近端梯度下降：

$$v^{t+1} = x^t - \nabla_x f(x^t),$$
$$x^{t+1} = \text{argmin}_x \|x - v^{t+1}\|^2 + r(x).$$

上面的第一行执行梯度步，以最小化$f(x)$；而后一行称为近端映射，用于减小$r(x)$。

经典迭代算法（如近端梯度下降）有若干优点：它们易于理解，而且只需更改数据保真项$f(x)$，就能轻松融入有关测量过程$A(\cdot)$的领域专业知识。遗憾的是，经典算法的性能远不及纯粹的基于深度学习的方法；后者借助大量配对样本$\{(x_l, y_l)\}_{l=1}^{L}$，，可以训练神经网络，将测量值$y$有效映射为图像$x$。这种性能的提升通常是以牺牲灵活性为代价的——网络针对特定测量过程$A(\cdot)$进行训练和专门化；一旦测量过程发生变化，该网络便毫无用处。

即插即用（PnP）优化是一种混合重建框架，既能保留经典算法的可解释性和灵活性，又能充分利用强大的数据驱动先验 [1]。PnP 优化的核心思想是，可以将现成的（基于学习的）图像去噪器 $D(z)$ 解释为一种解决方案，

$$D(z) = \text{argmin}_x \|x - z\|^2 + r(x),$$

对于某种隐式的数据驱动先验 $r(x)$。这种解释使我们能够将去噪器“插入”现有的迭代算法中。例如，即插即用近端梯度下降可以写作

$$v^{t+1} = x^t - \nabla_x f(x^t),$$

$$x^{t+1} = D(v^{t+1}).$$

该算法与标准近端梯度下降形式相同，但将近端映射步骤替换为一种强大的图像去噪算法。

PnP算法有别于纯数据驱动和纯经典的计算成像重建技术，其独特之处在于能够结合（1）以如下形式体现的领域专业知识：前向测量算子 $A(\cdot)$；以及（2）关于数据集分布的数据驱动先验，具体表现为使用大量训练样本训练得到的图像去噪器 $\{x_l\}_{l=1}^{L}$ **(图 4.1)**。PnP算法代表了计算成像重建领域的当前最先进水平 [2]。

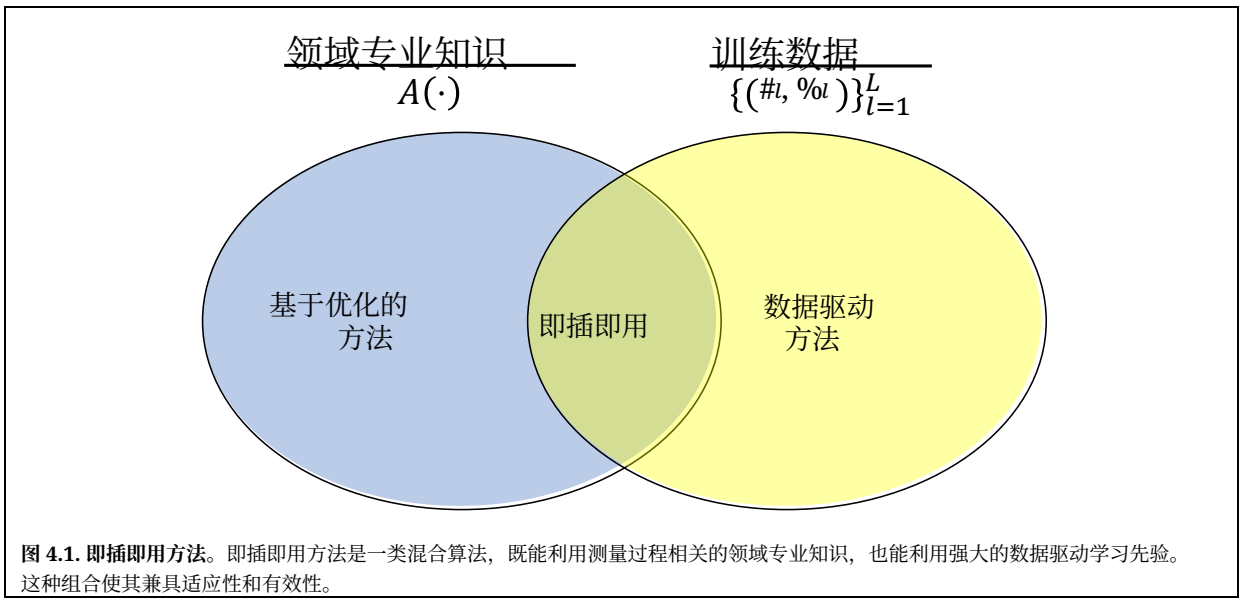


**图 4.1. 即插即用方法**。即插即用方法是一类混合算法，既能利用测量过程相关的领域专业知识，也能利用强大的数据驱动学习先验。这种组合使其兼具适应性和有效性。

**当前与未来的挑战**

PnP算法面临着若干障碍，因此在实践中应用起来颇具挑战。

前向模型失配：与几乎所有其他重建方法一样，PnP算法依赖于对前向测量模型 $A(\cdot)$ 的准确了解。如果前向模型设定有误，重建结果中就可能出现严重伪影。

去噪器模型失配：PnP算法通常使用现成的去噪算法，这些算法往往假设待去除的噪声服从加性白高斯分布。然而，一般而言，“有效噪声”（即真实信号与输入去噪器的中间解之间的差异）既非高斯噪声，也非白噪声，因此现有的去噪算法并非最优。此外，去噪器是在特定类别的数据（例如自然图像）上训练的，应用于其他分布（例如磁共振成像）时，其性能可能会下降。

参数调优：大多数PnP算法都包含多个超参数（步长、正则化强度等）。这些参数可能在每次迭代时发生变化，正确设置它们对于获得最佳性能至关重要。解决参数调优问题的一种方法是将迭代式PnP算法“展开”为前馈神经网络（**图4.2**），并利用训练数据和反向传播自动调优其参数 [3]。然而，展开会牺牲灵活性：此时网络针对特定的前向算子 $A(\cdot)$，而且自身也有一系列局限。

内存使用：训练展开算法需要通过去噪器的多个副本反向传播误差，因此必须存储许多中间变量。处理高维数据（例如时变体数据）时，存储这些中间变量所需的内存可能会大到难以承受。

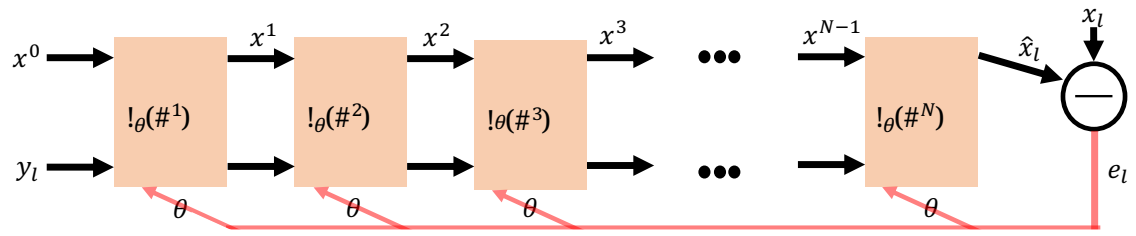


**图4.2。展开过程。** 可以将PnP算法的N次迭代“展开”为一个N层前馈神经网络。展开过程使我们能够利用训练数据调节和优化其众多参数，但代价是灵活性降低：最终得到的网络会针对特定的前向测量过程进行专门化。

**应对挑战的科学技术进展**

人们已经提出了大量解决方案，以应对上述挑战。

前向模型失配：如果处理的是参数化前向模型$A_\gamma(\cdot)$，则可以通过交替最小化同时恢复目标图像$x$和前向模型参数$\gamma$。具体而言，除了通常的PnP步骤外，还可以针对前向模型参数最小化目标函数。这一思路的变体已成功应用于X射线计算机断层扫描[4]，、磁共振成像[5]，和全息术[6]。

去噪器模型失配：去噪器模型失配表现为噪声分布不匹配和数据分布不匹配。前一个问题可以通过展开过程[3]或仔细表征每次迭代的噪声分布[7]来解决。后一个问题在很大程度上仍未解决，不过在实践中，去噪器通常对这种失配具有相对较强的鲁棒性。

参数调优：虽然展开是进行参数调优最直接的方法，但展开算法在很大程度上（尽管并非完全如此）放弃了适应新测量算子的能力。为避免这种权衡，近期有人提出了强化学习等替代参数调优方法。

内存使用：通过采用可逆网络架构，可以重新计算网络输出中的中间激活，从而降低训练展开算法所需的巨额内存开销。另一种提高内存使用效率的方法，是采用数据保真度更新步骤的随机近似。

**总结**

PnP算法提供了一种便捷的框架，将经典的、基于优化的计算成像重建方法的适应性与可解释性，与深度学习强大的先验和高效性结合起来。本文介绍了PnP重建领域的一些最新进展，并阐述了应用基于学习的PnP算法时应避免的一些陷阱。

**致谢**

本工作得到*AFOSR*青年研究者计划奖*FA9550-22-1-0208*的资助。

**参考文献**

[1] S. V. Venkatakrishnan、C. A. Bouman和B. Wohlberg，“用于基于模型重建的即插即用先验”，载于*2013*年*IEEE*信号与信息处理全球会议，2013年。[2] R. Ahmad、C. A. Bouman、G. T. Buzzard、S. Chan、S. Liu、E. T. Reehorst和P. Schniter，“用于磁共振成像的即插即用方法：使用去噪器进行图像恢复”，*IEEESignal Processing Magazine* **37**(1)，105–116，2020年。[3] K. Gregor和Y. LeCun，“学习稀疏编码的快速近似”，载于*IEEE*学报*27th* 国际机器学习会议，2010年。[4] M. Xie、J. Liu、Y. Sun、W. Gan、B. Wohlberg和U. Kamilov，“使用去噪正则化进行联合重建和校准及其在计算机断层成像中的应用”，载于*IEEE/CVF*国际计算机视觉会议研讨会，蒙特利尔，2021年。[5] D. Gilton、G. Ongie和R. Willett，“成像逆问题的模型自适应”，*IEEE*计算成像汇刊 **7**，661–674，2021年。[6] C. J. Pellizzari、M. F. Spencer和C. A. Bouman，“相干即插即用：采用基于模型的迭代重建和卷积神经网络穿过大气湍流进行数字全息成像”，*IEEE*计算成像汇刊 **6**，1607–1621，2020年。[7] S. K. Shastri、R. Ahmad、C. A. Metzler和P. Schniter，“用于磁共振图像恢复的去噪广义期望一致近似”，*IEEE*信息论选题期刊，2022年。[8] K. Wei、A. Aviles-Rivero、J. Liang、Y. Fu、C.-B. Schönlieb和H. Huang.，“用于逆成像问题的免调参即插即用近端算法”，载于国际机器学习会议，PMLR，2020年。[9] M. Kellman、K. Zhang、E. Markley、J. Tamir、E. Bostan、M. Lustig和L. Waller，“面向大规模计算成像的内存高效学习”，*IEEE*计算成像汇刊 **6**，1403–1414，2020年。[10] J. Liu、Y. Sun、W. Gan、X. Xu、B. Wohlberg和U. S. Kamilov，“SGD-Net：具有理论保证的高效基于模型的深度学习”，*IEEE*计算成像汇刊 **7**，598–610，2021年。

# 5 — 加速光力模拟

Isaac CD Lenton[1,2], Halina Rubinsztein-Dunlop[2,3]

1. 奥地利科学技术研究所（ISTA），克洛斯特新堡 3400，奥地利 2. 数学与物理学院，昆士兰大学，布里斯班 4072，澳大利亚 3. 澳大利亚研究理事会工程量子系统卓越中心，昆士兰大学，布里斯班 4072，澳大利亚

## 状态

光镊（OT）是一种功能强大的工具，可用于操控和处理液体、气体或真空中的微观样品 [1]。自阿瑟·阿什金发明光镊以来 [2]，，它们已发展成为一种可靠的工具，广泛应用于多个学科领域 [3]。光镊利用光的光力来捕获和操控对象；最简单的形式可以看作一种光学谐振弹簧，在适当条件下，它能够将粒子固定在三个维度上，并仅通过移动光束焦点使其移动。弹簧的强度与光束的光功率成正比。当光阱的特性得到充分表征，即弹簧刚度已知时，光镊便成为测量皮牛顿量级的力、纳米级位移和力矩的有力方法，只需直接监测粒子被捕获时的运动即可。

光镊的模拟和模型常常有助于其发展，也有助于验证和理解实验观测 [4]。例如，要理解光阱捕获的运动细菌所呈现的动力学，对光力的透彻理解有助于阐明细菌运动性涉及的非光学力。根据粒子的尺寸和形状，通常需要采用不同的陷阱描述方法，从类似于一个或多个简谐弹簧的简单方法，到求解麦克斯韦方程组的方法。主要限制往往在于能否利用这些模型对实验作出预测。这可能是由于计算限制——评估模型需要计算能力方面的提升 [5]；也可能是因为现有代码不够易用，文档不够完善。复杂模型往往包含许多参数，而且要验证这些模型能否准确描述特定实验并非易事。

机器学习（ML）涵盖多种技术，包括深度学习和计算机辅助统计推断，近年来人气大幅提升。随着计算能力增强，同时易于获取的算法数量不断增加，机器学习已应用于众多领域。过去几年中，我们看到机器学习技术被用于解决与光镊相关的问题，包括对光力进行建模 [6, 7]以及从实验中提取相关信息 [8, 9]。这些早期研究前景广阔，表明机器学习有望大幅加快光镊模拟，同时让希望对实验进行建模和理解的研究人员更容易使用准确的模型。

## 当前与未来的挑战

多项挑战限制了精确光镊模型的应用，包括计算能力有限、难以验证模型是否准确反映现实，以及研究人员获取模型的便利性。

**准确模拟大型复杂粒子和结构光场**可能颇具难度。尽管计算机的速度和内存容量已显著提升（扩大了可模拟情况的范围），但对许多研究人员而言，即使是模拟大型球形粒子也仍然很困难

使用现有硬件[1]，更不用说利用光镊进行研究时常见的细菌或可变形细胞等更复杂的几何形状。要模拟光镊中这些粒子的动力学，仿真必须足够快。模拟大型复杂粒子/光束的一种方法，是使用性能更强的计算机或计算机集群预先计算作用力。随后可以通过插值来近似数据集中未包含的中间点处的作用力。然而，这只是将问题从处理器受限转变为内存/存储受限。另一种方案是使用机器学习，将所有这些信息编码为更精简的表示。使用插值或这类机器学习时，主要挑战之一是生成足够的训练数据，使其覆盖具有代表性的一系列参数（光束形状、粒子尺寸等）。

开发光镊计算模型的主要难点之一是**确定这些模型能否准确反映现实**。并非所有模型都适用于不同尺寸范围：例如，偶极近似对于偶极尺寸的粒子可能非常有效，但用于较大的粒子时结果却不可靠；同样，几何光学对于较大的粒子可能效果很好，但用于较小的粒子时会产生错误结果。有时可能需要结合多种模型，并且必须谨慎确定何时应使用特定模型，以及该模型是否适用。模型是否适合或准确地描述所要模拟的特定实验，往往需要由用户自行评估。无论使用传统模型还是机器学习赋能模型，都必须注意确保模型的预测准确反映现实。

最后一项挑战是**可用性与可访问性**。针对光阱捕获粒子，已有许多出色的模型，但其中许多并不容易使用或获取。在某些情况下，用户需要特定的操作系统，或熟悉某些编程语言，才能使用/运行代码（其中一些可能是专有的）。用户成功运行模型后，还需要学习如何使用模型并评估其有效性。例如，离散偶极近似在对多种粒子进行建模时极为有用，但体素位置、尺寸和间距的选择会极大影响模拟结果，因此必须谨慎选择合适的参数并验证结果。这需要完善的文档，包括能够清楚说明代码不同版本之间差异的发行说明。这些额外工作有时会在开发代码的研究人员与希望将代码用于实验的用户之间造成障碍。此外，在某些情况下，研究人员担心代码可能被误用，因此不愿发布代码。

[1] 借助光学镊子工具箱和光学镊子仿真软件包中广义洛伦兹-米氏理论与几何光学的实现，我们只能模拟尺寸最大约为 100 μm 和 1 mm 的粒子。我们仅测试了这些方法能否在可行的时间内处理这些尺寸的粒子，并未检查这些尺寸下的结果是否准确。

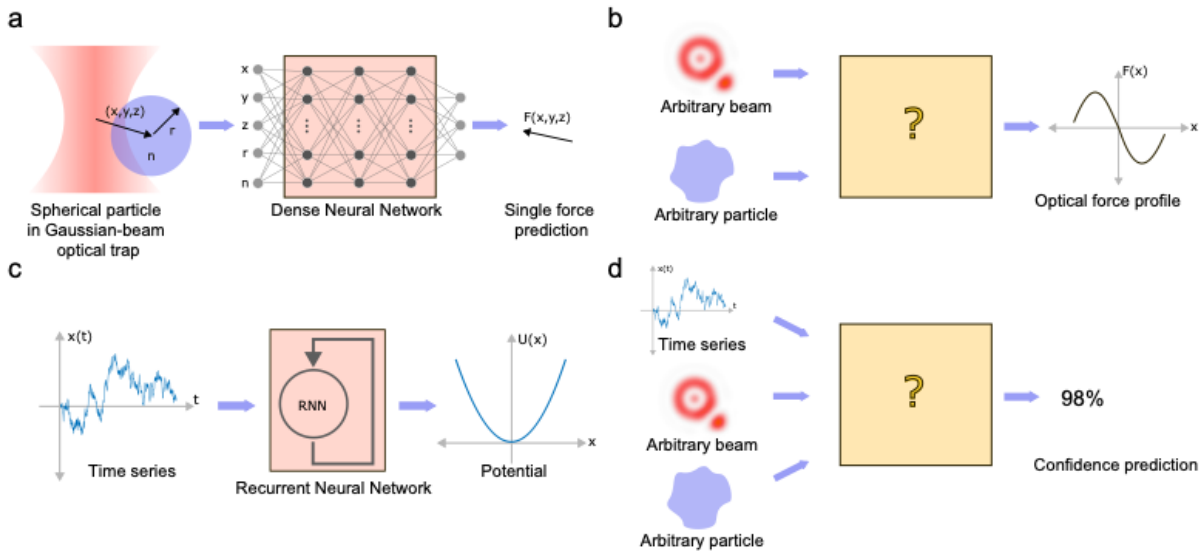


**图5.1。用于模拟光镊的不同方法在当前经典方法、机器学习赋能方法及未来潜在能力方面的比较。**阴影区域表示各方法在时间、可用性、内存和问题复杂度方面的表现：区域越大，性能／可用性越好。图中大致归纳了用于模拟光镊的不同方法路线：基函数方法（如T矩阵和基于偶极近似的方法）、离散方法（包括离散偶极近似和基于有限差分的方法）、几何光学，以及组合机器学习方法有望带来的进展（详见正文）。

**应对挑战的科学技术进展**

用于光镊建模的优秀算法并不少见。尽管仍有许多亟待解决的挑战（例如，参见 [10] 的第 7—11 节），但对许多从事光镊研究的人员而言，问题更多在于可访问性/可用性。在某些情况下，这是由于计算能力有限、无法确定某种方法是否适用于特定问题，或仅仅是因为方法的下载/安装是否方便。为概述这一问题，**图5.1**展示了参考文献 [4] 中方法比较图的当前版本，并增加了可用性这一维度。我们将方法分为三大类。可处理的问题复杂度由单一维度表示（在一定程度上反映了最小/最大尺寸以及光束/粒子复杂度）。

机器学习已经拓展了传统技术所能实现的边界。例如，在我们的工作中[6]，，我们展示了**图5.2a**所示的人工神经网络（即一种特定的机器学习技术）如何显著降低仿真对内存和时间的需求。该网络使用特定光束/粒子组合的代表性力值进行训练，能够快速预测其他位置的力值，同时比插值占用的内存显著更少。我们以 T 矩阵方法为例展示了这项技术，此后也有研究展示了类似方法如何加速几何光学仿真[7]。这项技术有望提高可及性和可用性，因为生成的网络通常足够小、速度足够快，可以嵌入交互式网页浏览器仿真中。这类模型的主要不足在于泛化能力：例如，针对球形粒子训练的模型并不适合预测椭球形粒子所受的力和力矩。理想情况下，我们希望模型更接近图2b：以光束和粒子为输入，并生成力场[2]。要实现这一点，必须生成充足的训练数据。这很可能需要选择一种泛化能力较强的网络架构，以便用少得多的训练数据学习特征。例如，与图 5.2b中的网络相比，卷积网络在输入光场和粒子的图像时可能表现更好，因为

[2] 对于非球形粒子，这将是一个六维空间，涵盖粒子所有可能的位置和取向 .

与**图 5.2b**中的网络相比。迁移学习或重新训练模型等其他技术，也可能是减少所需训练数据量的关键。

机器学习还为验证模型是否能正确描述实验提供了一个潜在解决方案。机器学习技术已用于分析实验测量值，例如，可用于从粒子轨迹中提取势 [8]。**图 5.2c**展示了一个循环神经网络（另一种机器学习技术），它能将时间序列测量转换为势。通过将这些势与模型预测的光力进行比较，我们可以验证模型的准确性。**图 5.2d**展示了一种可能的扩展方案：训练一个网络，以一定的置信度判断模型（光束/粒子描述）是否足以描述某项特定的实验观测。这种问题定义的一个优点是，我们可以将用于训练网络的同一组优化函数也用于优化模型参数（光束/粒子形状）。

最后需要指出的是，机器学习热潮兴起的同时，用于共享代码和协作开展机器学习模型训练的工具也取得了许多进展。值得一提的工具包括：

1. 版本控制软件（如 Git 和 SVN）及相关托管网站（如 GitHub 和 GitLab）提供了用于追踪代码以及已知问题、特征和开发进展的工具。2. Papers with Code：一个任何人都可以分享论文中所述算法实现的网站。3. 容器（如 Docker 和 Singularity）提供了一种打包方式，打包的不仅是代码，还包括整个工作环境（即特定版本的软件及其依赖项）。4. Read the Docs：一个在线文档托管网站，可设置为自动接入常用的源代码分销工具，并在发布新版本代码时自动生成和发布文档。

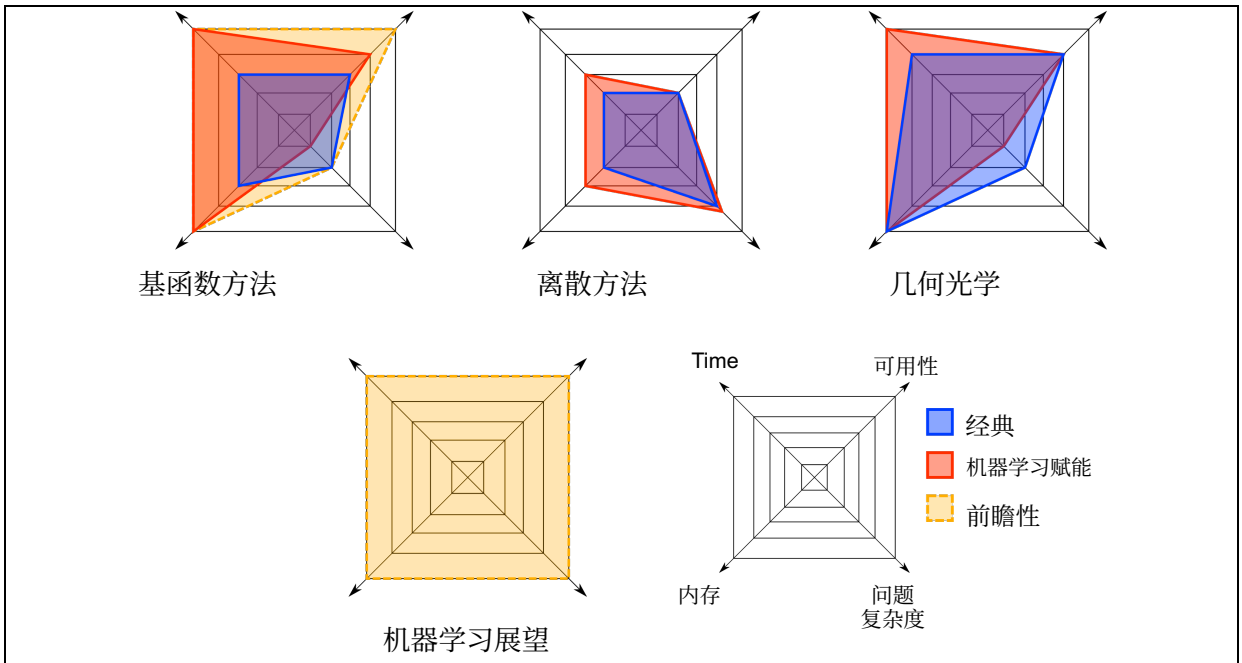


**图 5.2. 用于光镊模拟与分类的不同机器学习模型示意图。**（**a**）一种具有 5 个自由度的网络，用于计算高斯光束光镊中球形粒子所受的力（改编自参考文献 [6]）。（**b**）机器学习的一种更通用的目标：由网络将任意光束和粒子分布转换为力场。（**c**）从实验时间序列测量值中提取光学势的循环网络示例（改编自参考文献 [9]）。（**d**）一种用于估计给定光束/粒子是否能够良好预测观测轨迹的网络。

**总结**

我们已经看到，机器学习能够提升用户获取强大光镊模型的便利性，而无需用户拥有性能极强的计算机。我们也看到，机器学习热潮带来了连锁效应，推动软件工具改进，从而促进更好的文档编写与协作。在机器学习的助力下，粒子追踪和光镊校准方面的改进有望确保我们生成的模型准确无误。上述进展总结于**图5.1**中。我们目前设想这些进展还将进一步扩展；其中一项主要限制是资源，包括生成大型数据集、训练模型以及探索其他模型架构所需的时间。我们应当期待新的机器学习模型不断拓展光镊模拟的可能性。我们甚至可以设想一种通用的光镊模拟器，能够覆盖并统一现有数值模型在各种有用场景下的能力，为光镊领域所用。这需要涵盖各种光束和粒子的准确数据集。为实现这一目标，我们需要让现有模型更易于使用。虽然本文聚焦于光镊，但其中许多技术也可用于模拟其他系统，例如声镊、电动力学阱和光学成像。

**致谢**

*H.R-D* 获得了澳大利亚研究理事会发现项目 *DP180101002*，以及澳大利亚研究理事会工程量子系统卓越中心（*EQUS*，*CE170100009*）的资助。

**参考文献**

1. K. Dholakia、P. Reece 和 M. Gu，《光学微操纵》，《化学学会评论》 **37**，42–55，2008年。2. A. Ashkin、J. M. Dziedzic、J. E. Bjorkholm 和 S. Chu，《介电粒子单光束梯度力光学陷阱的观察》，《光学快报》 **11**(5)，288–290，1986年。3. P. Polimeno、A. Magazzù、M. A. Iatì 等，《光镊及其应用》，《定量光谱学与辐射传输杂志》 **218**，131–150，2018年。4. A. A. M. Bui、A. B. Stilgoe、I. C. D. Lenton、L. J. Gibson、A. V. Kashchuk、S. Zhang、H. Rubinsztein-Dunlop 和 T. A. Nieminen，《光镊模拟的理论与实践》，《定量光谱学与辐射传输杂志》 **195**，66–75，2017年。5. S. Hanna 和 T. S. Morling，《高阶贝塞尔光束中粒子簇的堆积与动力学》，载于复杂光场与光学力 *XVI* 会议论文集；PC120170N，2022年。6. I. C. D. Lenton、G. Volpe、A. B. Stilgoe、T. A. Nieminen 和 H. Rubinsztein-Dunlop，《机器学习揭示光阱捕获粒子的复杂行为》，《机器学习：科学与技术》 **1**，045009，2020年。7. D. B. Ciriza、A. Magazzù、A. Callegari、G. Barbosa、A. A. R. Neves、M. A. Iatì、G. Volpe 和 O. M. Maragò，《利用神经网络更快、更准确地计算几何光学光力》，*ACS Photonics* 2022年。https://doi.org/10.1021/acsphotonics.2c01565 8. S. Helgadottir、A. Argun 和 G. Volpe，《深度学习增强的数字视频显微术》，*Optica* **6**(4)，506–513，2019年。9. A. Argun、T. Thalheim、S. Bo、F. Cichos 和 G. Volpe，《通过机器学习增强力场校准》，《应用物理评论》 **7**，041404，2020年。10. G. Volpe、O. M. Maragò、H. Rubinzstein-Dunlop 等，《光镊路线图》，《物理学杂志：光子学》，2022年。

# 6 — 用于全光计算和成像的光学网络

Daniel Brunner[1], Bijie Bai[2], Aydogan Ozcan[2]

1. P. M. Duffieux 光学系，FEMTO-ST 研究所，弗朗什-孔泰大学，法国国家科学研究中心 UMR 6174，贝桑松，法国 2. 电气与计算机工程系，加利福尼亚大学洛杉矶分校，洛杉矶（加利福尼亚州），美国

## 现状

光学神经网络（NN）历史悠久。其历史始于1985年，当时具有开创性的实验实现了霍普菲尔德网络的光学版本 [1]。最初的动机至今未变：利用光学系统固有的特性——大规模并行性，以及由此为连接主义神经网络计算理念带来的优势。1993年，这一愿景确实成为现实：一项实验展示了实时人脸识别，并在训练过程中对全息存储权重进行了优化 [2]。

此后，人工智能经历了多轮热潮与退潮，直到近些年才成为不可或缺的工具。如今的高性能电子设备能够实现复杂度和能力不断提升的神经网络拓扑结构。然而，计算硬件与神经网络拓扑结构之间的根本性不匹配，在可扩展性、能源消耗和速度方面造成了巨大挑战。因此，为其他设备增加神经网络功能会带来相当大的功耗预算，而对高容量数据进行实时处理也难以实现。将神经网络用于实时高分辨率宽视场显微成像，或用于小型非实验室系统，仍然颇具挑战。因此，光学神经网络仍备受关注；近年来，人们对这类非传统硬件的关注更是激增。

## 当前与未来的挑战

目前，面向下一代神经网络光子硬件的研发包括集成光子解决方案 [3] 和自由空间解决方案 [4-6], ，以及应对使用三维光子集成集成神经网络时的根本挑战的方法 [7] ，或释放完全并行的自主光子神经网络的超高速潜力 [8]。

作为一种自由空间光计算平台，衍射深度神经网络（$D^2NNs$）日益受到关注。它们通过设计光在一系列复杂的空间结构化表面上的衍射来计算给定任务，各层依次排列。针对特定任务，人们运用深度学习概念优化这些层，以最小化特定于任务的损失函数。由此得到的衍射层共同构成一台全光计算机，实现输入视场与输出视场之间所需的变换。基于深度学习的训练完成后，可以通过 3D打印或光刻等方式制造衍射层，从而创建一个物理网络，使其以光传播的速度执行设计好的计算任务，且除照明光外无需任何外部电力。

自首次展示以来 2018 [4], ，衍射神经网络已成功应用于多种场景，例如全息术 [10], 、定量相位成像（QPI）[9] 和类别特异性成像 [13]。与使用电子数字处理器相比，计算成像中的衍射神经网络推理具有一些独特优势，因为场景的光学信息可直接被衍射网络获取。因此，无需数字化或复杂的预处理步骤（例如相位恢复），即可实现无需计算机的“计算成像”。借助训练好的衍射神经网络，任何未知对象的空间信息都能以光传播的速度从原始全息图中即时恢复，无需使用任何数字处理器 [10] 。衍射神经网络 [2]

还可以经过训练，将任意输入场景的相位信息直接转换为其输出平面上的强度分布，从而构建全光学定量相位成像系统 [9] （**图1a**）。研究表明，这种定量相位成像衍射网络能够泛化至未见过的全新相位物体。

D²神经网络也已应用于穿过漫射介质成像，这在生物医学光学、大气物理学、天文学、海洋学和自主系统等多个领域都至关重要。研究人员证明，经过训练的 D²神经网络能够通过全光学方式恢复被未知随机相位扩散器完全扭曲的任意对象图像，为穿过随机且未知的扩散器成像提供了一种实时、无需计算机且高能效的解决方案 [14] （**图1b**）。

另一个例子是，D²神经网络为设计具有定制功能的新型计算相机系统提供了独特的机会，而这些功能无法通过标准光学设计实现。例如，研究人员基于 D²神经网络设计了一种新型隐私保护成像器，它只对特定的目标类型对象成像，同时通过全光学方式即时从输出图像中抹除其他非目标类型的对象 [13] （**图1c**）。

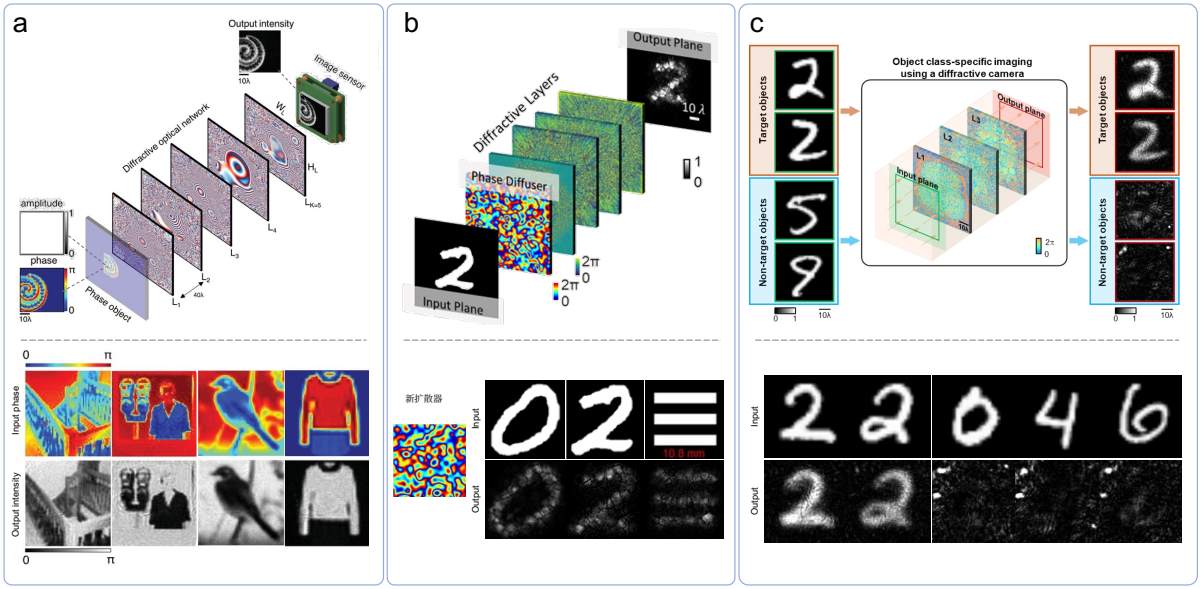


**图6.1. 用于计算成像的 D²神经网络应用示例。** （**a**）使用 D²神经网络进行定量相位成像（QPI）。改编自参考文献 [9]。（**b**）使用 D²神经网络穿过随机、未知的扩散器成像。改编自参考文献 [14]。（**c**）使用 D²神经网络设计分类相机。改编自参考文献 [13]。

**应对挑战的科学技术进展**

因此，这些应用潜力巨大，涵盖范围广泛。一个重要挑战仍然存在：如何将定义神经网络拓扑结构的众多数值（即连接的权重）进行物理集成。在二维空间中，这类物理实现无法扩展，因此近期的关注点已转向全面的三维集成。Moughames 等人 [7] 展示了通过三维光子波导集成的光学卷积滤波器（**图2a**）；与此同时，相关制造技术的一些进展如今已实现光学耦合器的低损耗、大规模三维光子集成 [11, 12]。

最后，要显著提高神经网络计算的速度，需要在并行硬件中实现所有相关过程，消除因未在每个计算阶段利用完全并行性而采用的方案中大规模串行通信所导致的速度下降。近期，有研究通过在多模半导体激光二极管的高维状态空间中实现光学神经网络，展示了这一点

，并通过空间光调制器实现可训练网络权重。因此，基于优化权重的线性运算和非线性变换均以并行方式进行，带宽约为 20 吉赫兹 [8], **(图2b)**。

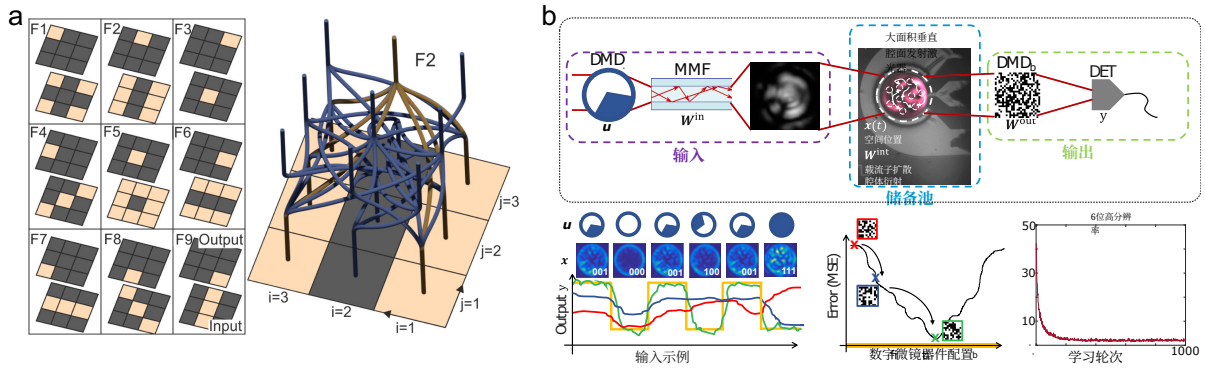


**图 6.2. 迈向三维光网络。(a)** 三维集成九个哈尔滤波器（F1–F9）的示意图。右侧展示了可并行实现全部九个滤波器的3D打印波导架构，其中滤波器 F2 以橙色突出显示。改编自参考文献 [7]。**(b)** 多模半导体激光二极管中循环神经网络的实现方式（上）及其相关学习概念（下）。改编自参考文献 [8]。

## 总结

总之，借助完全并行的光学神经网络，计算成像任务能够以光传播的速度，在紧凑且有望实现集成的光子系统中执行，从而建立低功耗、高速的全光计算平台，突破现有电子系统的能力局限。自由空间衍射计算框架可扩展至电磁波谱的不同部分，包括可见光和红外波长，有望广泛应用于高吞吐量计算任务，并启发面向先进机器视觉和通信系统的智能光学前端设计。另一方面，三维光子集成提供了实现此类概念可扩展光子集成的工具和技术；而使用半导体激光器等高维非线性光学介质，则为光子计算开启了另一种潜能：超高速度。


## 致谢

作者感谢大众汽车基金会、勃艮第-弗朗什-孔泰大区、欧盟委员会、美国海军研究办公室以及美国空军科学研究办公室（*AFOSR*）的支持。


## 参考文献


1. N. H. Farhat、D. Psaltis、A. Prata 和 E. Paek，《Hopfield模型的光学实现》，《应用光学》 **24**，1469，1985年。2. H. S. Li、Y. Qiao 和 D. Psaltis，《用于实时人脸识别的光学网络》，《应用光学》 **32**，5026，1993年。3. Y. Shen 等，《利用相干纳米光子电路进行深度学习》，*Nature Photonics* **11**，441，2017年。4. X. Lin 等，《使用衍射深度神经网络实现全光机器学习》，《科学》 **361**，1004，2018年。5. Rafayelyan 等，《用于时空混沌系统预测的大规模光学储备池计算》，*Phys. Rev. X* **10**，041037，2020年。

6. T. Zhou 等，《利用可重构衍射处理单元实现大规模神经形态光电计算》，*Nature Photonics* **15**，367，2021年。7. J. Moughames 等，《用于光子神经网络可扩展集成的三维波导互连》，*Optica* **7**，640，2020年。8. X. Porte 等，《半导体多模激光器中的完整并行自主光子神经网络》，*J. Phys. Photonics* **3**，024017，2021年。9. D. Mengu 和 A. Ozcan，《全光相位恢复：用于定量相位成像的衍射计算》，*Advanced Optical Materials* **10**，2200281，2022年。10. M. S. Sakib Rahman 和 A. Ozcan，《利用衍射网络实现无需计算机的全光全息图重建》，*ACS Photonics* **8**(11)，3375–3384，2021年。11. X. Porte 等，《直接（3+ 1）D 激光写入渐变折射率光学元件》，*Optica* **8**，1281，2021年。12. A. Grabulosa 等，《（3+ 1）D打印绝热1至N宽带耦合器》，arXiv:2208.09767，2022年。13. Bai, B.、Luo, Y.、Gan, T. 等，《成像还是不成像：利用全光方式擦除不需要对象的类别专用衍射相机》，*eLight* **2**，14（2022年）。14. Luo, Y.、Zhao, Y.、Li, J. 等，《无需计算机的计算成像：以光速透过随机扩散器观察》，*eLight* **2**，4（2022年）。

# 7 – 定量显微术

Daniel Midtvedt[1]

1. 物理系，哥德堡大学，瑞典

## 状态

光学显微成像极大地增进了我们对微观世界的理解，并广泛应用于众多学科。传统工作流程包括：(1) 数据采集，依靠人工调整聚光镜、照明强度和相机曝光时间；(2) 对采集到的显微图像进行目视检查；随后 (3) 对样品进行定性评估。由于这一工作流程缺乏标准化，光学显微成像成为一种定性而非定量的技术。

为了解决这一局限，我们首先指出，定量显微术要求光学系统中不可控和／或不可测的参数不会影响测量结果。这将可测量量限制为不受光学系统参数影响的量。此类可测量量的范围取决于所选的显微方法。显微技术的发展与数据分析技术的发展相辅相成：新的显微技术可以扩展不受参数影响的量的范围，因此需要能够对其进行定量分析的新分析技术。在此背景下，深度学习驱动的分析已成为一种替代方案，可快速、准确且自动化地分析和定量处理显微镜数据。例如，样品中对象的位置和运动不受照明参数或光学系统参数的影响。因此，对于大多数显微技术而言，粒子追踪是典型的不受参数影响的技术。由此可见，人们投入大量精力开发准确高效的追踪技术并不令人意外。研究表明，深度学习驱动的分析在准确度和速度方面均优于算法技术，同时实现了全自动化和客观化 [1]。

此外，全息术、干涉散射显微术和光学相干断层成像等干涉测量技术，有望定量分析来自对象的散射光的量，在某些情况下还可分析其角分布和/或光学相位偏移。进而，这些信息可与样品中对象的物理参数相关联，例如其质量 [2], 尺寸和折射率 [3]。同样，基于深度学习的技术已证明，在量化此类参数时，尤其是在信噪比较低的情况下，具有更高的准确性和速度 [4]。

最后，多光谱或高光谱成像模态（如拉曼成像或布里渊成像）会记录每个像素的光学响应光谱，从而生成海量数据集。在此背景下，深度学习为从这类数据集中自动提取相关数据提供了一种强有力的方法 [5]。

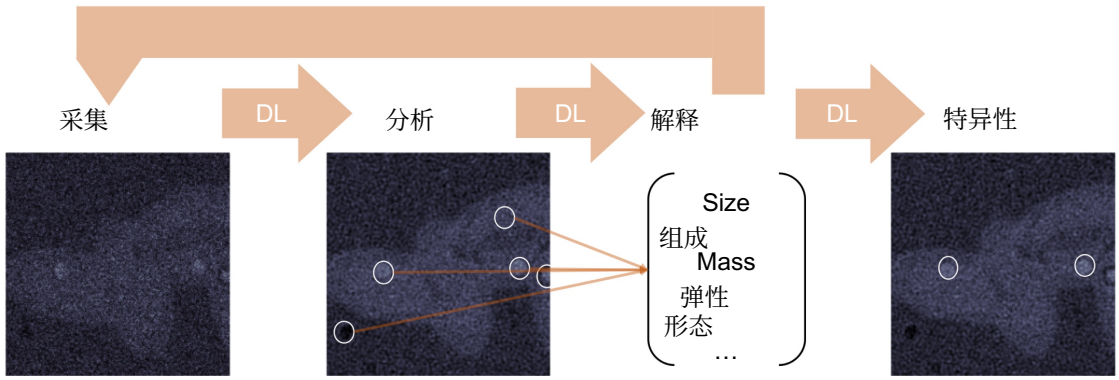


**图 7.1 实现具有特异性的定量显微术的一种初步工作流程。** 首先进行采集，采集速度必须足够快，分辨率也必须足够高，以解析感兴趣对象的特性和动力学。接下来分析数据，以增强对比度，并解析和检测数据中的对象。正如箭头所示，深度学习（DL）可辅助这一过程。检测到目标后，根据对象的光学响应对其一系列物理特性进行量化，这一过程也可由深度学习辅助。提升这些步骤的抗噪能力，可反馈至采集步骤，从而实现更快的采集（但也会增加数据中的噪声）。最后，可通过识别感兴趣对象的共同特性来实现特异性。图像由软件 DeepTrack 2 [6] 模拟生成。

## 当前与未来的挑战

可以说，定量显微术领域的终极目标，是准确量化样品中特定组分的物理属性。一般而言，要实现这一目标，需要将目标组分的信号与其他组分的信号区分开来（可能的工作流程见**图 7.1**）。要进行定量分析，则需要（**1**）在单个对象层面上量化足够多的物理参数，以便对样品中的对象进行分类。在复杂环境中（生物样本便常常如此），多个组分通常彼此接近，因此这些组分的信号会相互交织，难以直接区分。因此，要发挥作用，此类特定成像技术需要（**2**）具备良好的抗噪声能力，并且（**3**）具有较高的空间分辨率（最好达到亚衍射极限）。此外，由于组分通常具有动态性，（**4**）具备较高的时间分辨率（1–10 毫秒）也至关重要。

更具体地说，干涉测量技术通常具有较高的时间分辨率，满足上述要求（**4**）。研究也已表明，深度学习驱动的分析技术有望在高噪声水平（**2**）和短长度尺度（**3**）（与衍射极限相当）下，对单个对象的物理参数进行定量分析，[4], 其速度远快于传统方法[3]。从单个纳米尺度物体中可定量分析的参数取决于对象尺寸和成像模态，目前仅限于质量（对于瑞利散射体）[2], 以及尺寸和折射率（对于大于衍射极限的粒子）[4]。尽管这些参数在许多情况下可谓是关键物理参数，但它们可能不足以实现稳健的分类，也不足以进行具有高特异性的定量成像。因此，在不牺牲时空分辨率的前提下扩展参数集，是这些技术面临的一项关键挑战（**图 7.1**，“解释”）。一个特殊挑战是对大于瑞利极限但小于衍射极限的对象进行定量分析，因为在这一范围内，质量与光散射之间的关系并不明确，并且取决于光学系统的收集角以及对象内部的质量分布[8]。

对于拉曼成像和布里渊成像，每个像素所包含的信息是一个频谱，用于量化局部的光子/声子相互作用。在这种情况下，信号实际上具有材料特异性，可用于定量分析样品中不同材料的丰度和分布[7]，，从而满足上述要求（**1**）。该领域尚存的挑战在于，如何在复杂样品中检测和定量分析单个对象（**2**），同时实现较高的空间（**3**）和时间（**4**）分辨率（**图 7.1**，“分析”）。

因此，关键挑战是：

1. 在不牺牲时空分辨率的前提下，扩展干涉成像技术可定量分析的参数范围；2. 在不牺牲材料特异性的前提下，提高多光谱定量成像技术的时空分辨率和抗噪能力。

**应对挑战的科学技术进展**

应对这些挑战所需的技术和科学步骤如下。

首先，可通过波长和/或成像模态复用来增加干涉图像中的信息量，从而更容易定量分析辅助物理参数。

其次，分析时需要利用干涉散射图样所包含的全部信息。具体而言，对象散射出的光场的角分布不仅取决于其尺寸，还取决于其形状和内部质量分布。这些信息编码在干涉散射图样中，但要提取这些信息，通常需要反向求解麦克斯韦方程组。这种计算开销很大，而且对测量噪声极为敏感，尤其是在接近瑞利极限时。研究已表明，基于深度学习的方法能够更快速地确定物体属性 [3]，，即使在亚波长尺度、信噪比较低的情况下，仍能保持准确性 [4]。将这类定量分析方法拓展到对象形态及内部质量分布的定量分析，并覆盖从 < 100 纳米到数微米的尺寸范围，将是实现特异性干涉成像的必要步骤。

对于多光谱定量成像而言，关键挑战在于提高时空分辨率。近期研究表明，受激拉曼[7] 和布里渊显微术[9]有望实现快速多光谱成像，预计未来几年相关研究将进一步提升这些技术的分辨率。深度学习驱动的分析技术可通过不完整的光谱信息重构物理参数[7]，助力这一发展。这样一来，达到相同特异性水平所需的数据可能会减少，从而进一步提高时间分辨率。

将这些进展与虚拟染色技术的发展相结合，有望通过深度学习辅助分析实现特异性定量成像。虚拟染色已被证明能够识别、分类和定量非特异性成像模态中的结构[10] 。

**总结**

总而言之，在可预见的未来，定量显微术面临的重大挑战是如何将定量测量与高特异性结合起来，从而使这类技术成为荧光成像的可行替代方案。在这份路线图中，我讨论了如何

借助深度学习的数据分析可能有助于推动这一发展，并指出了实现这一目标所需的几个关键步骤。

**致谢**
作者感谢瑞典研究理事会提供的资助，项目编号为 *2019-05071*

**参考文献**
1. Helgadottir, S.、Argun, A. 和 Volpe, G.《深度学习增强的数字视频显微术》*Optica* 6(4), 506, 2019年。2. Young, G.、Hundt, N.、Cole, D.、Fineberg, A.、Andrecka, J.、Tyler, A.、Olerinyova, A.、Ansari, A.、Marklund, E. G.、Collier, M. P.、Chandler, S. A.、Tkachenko, O.、Allen, J.、Crispin, M.、Billington, N.、Takagi, Y.、Sellers, J. R.、Eichmann, C.、Selenko, P.……Kukura, P.《单个生物大分子的定量质量成像》《科学》360(6387), 423–427, 2018年。3. Altman, L. E. 和 Grier, D. G.《CATCH：使用深度神经网络对胶体进行全息表征与追踪》《物理化学杂志*B*》 124(9), 1602–1610, 2020年。4. Midtvedt, B.、 Olsén, E.、 Eklund, F.、 Höök, F.、 Adiels, C. B.、 Volpe, G. 和 Midtvedt, D.《使用深度学习增强的离轴全息术进行快速、准确的纳米颗粒表征》*ACS Nano* 15(2), 2240–2250, 2021年。5. Manifold, B.、Men, S.、Hu, R. 和 Fu, D.《用于高光谱图像分类和无标记预测的多功能深度学习架构》*Nature Machine Intelligence* 3(4), 306–315, 2021年。6. Midtvedt, B.、Helgadottir, S.、Argun, A.、Pineda, J.、Midtvedt, D. 和 Volpe, G.《利用深度学习进行定量数字显微成像》《应用物理评论》 8(1), 011310, 2021年。7. Lin, H.、Lee, H. J.、Tague, N.、Lugagne, J.-B.、Zong, C.、Deng, F.、Shin, J.、Tian, L.、Wong, W.、Dunlop, M. J. 和 Cheng, J.-X.《通过超快调谐和空间-光谱学习实现微秒指纹受激拉曼光谱成像》《自然·通讯》 12(1), 3052, 2021年。8. Bohren, C. F. 和 Huffman, D. R.《瑞利-甘斯理论》。载于《小粒子对光的吸收与散射》，2007年。9. Remer, I.、Shaashoua, R.、Shemesh, N.、Ben-Zvi, A. 和 Bilenca, A.《利用受激布里渊散射显微术实现高灵敏度和高特异性的生物力学成像》《自然·方法》 17(9), 913–916, 2020年。10. Helgadottir, S.、Midtvedt, B.、Pineda, J.、Sabirsh, A.、B. Adiels, C.、Romeo, S.、Midtvedt, D. 和 Volpe, G.《使用深度学习从明场细胞图像中提取定量生物学信息》《生物物理学评论》 2(3), 2021年。

# 8 — 计算相位显微术

Hao Wang[1], Lei Tian[1,2]

1. 波士顿大学电气与计算机工程系，美国马萨诸塞州波士顿 02215 2. 波士顿大学生物医学工程系，美国马萨诸塞州波士顿 02215

## 状态

定量相位成像能够对透明生物样本（如未染色细胞和组织）进行无标记成像。人们已开发出许多基于全息的相位成像技术，利用干涉测量原理提取相位信息。然而，这些技术通常需要复杂的仪器设备。在本文中，我们重点介绍计算相位显微技术，这类技术利用仅强度测量，从非全息装置中恢复相位信息。仅根据强度测量重建相位的主要难点在于，这通常是一个病态逆问题。经典的“相位恢复”算法基于 Gerchberg-Saxton-Fienup算法开发，通过迭代重建过程并引入额外的物理约束条件来求得解。近年来，深度学习（DL）在解决此类计算成像问题方面取得了巨大成功。本文将重点介绍深度学习推动计算相位显微术成像性能提升的若干重要进展，如**图 8.1**所示。

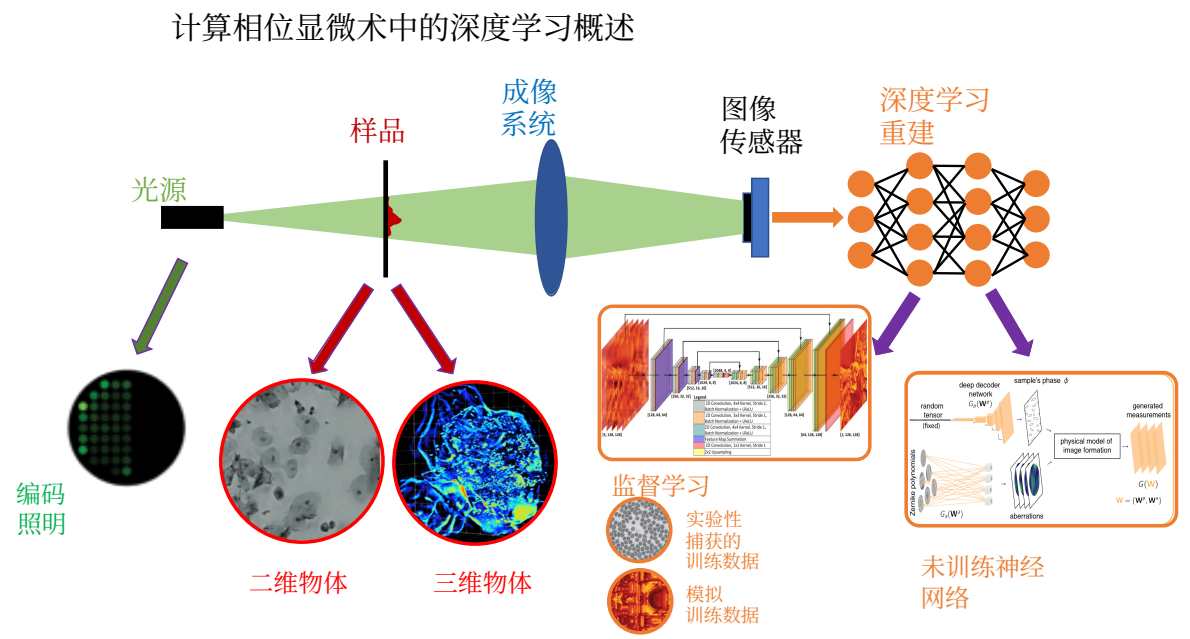


**图 8.1 计算相位显微术中深度学习的概述。** 深度学习已用于恢复二维 [1,3,5,6,7,8]和三维 [2,4,9,10] 相位物体，采用的方法包括监督学习 [1-4,7-9] 和未训练神经网络 [5,6,10]。对于监督学习，训练数据来自实验 [1,3,7] 或仿真 [2,4,8,9]。深度学习还被用于优化编码照明模式 [7,8]。底部的插图改编自参考文献 [1,4,6,8]。

总的来说，深度学习技术已被用于解决二维相位恢复和三维断层重建问题，如**图 8.1**所总结。对于二维计算相位成像，参考文献 [1] 提出的首个基于监督学习的重建算法表明，深度神经网络能够消除与孪生像和自干涉相关的衍射伪影。为了提升二维相位成像在低光照条件下的性能，一种深度学习技术应运而生，可在光子数较低时实现高保真恢复[3]。对于三维计算相位成像，已有深度学习框架用于解决

从仅强度测量中进行具有挑战性的三维层析相位重建问题 [2,4]。此外，研究人员还开发了相关框架，以减轻多重散射效应，并克服常用线性单次散射近似模型的局限性 [2,4]。

尽管这些有监督深度学习方法取得了显著进展，但它们需要大规模训练数据集，其中包含成对的测量数据和真实值图像。早期尝试侧重于生成实验采集数据集 [1, 3], ，但在实际实验中，大规模训练数据的获取可能受到限制。为克服这一局限，人们开发了多种创新方法。例如，研究人员开发了基于多重散射模型的高效且准确的仿真，用于生成三维问题的合成训练数据集 [2, 4]。无监督“未训练神经网络”框架基于 Deep Image Prior [5] 和 Deep Decoder [6] ，无需网络预训练或训练数据，也被改造用于二维相位恢复，而非采用有监督深度学习框架。在这种方法中，相位图由一个未训练网络进行参数化；随后，通过标准的迭代“网络训练”过程，利用已知物理模型，使预测测量结果与实际测量结果相匹配，从而优化网络参数。

除了在计算相位成像中仅执行事后二维或三维重建任务外，人们还开发了深度学习方法，将测量过程的物理设计与重建联合优化。开创性研究展示了一种“展开神经网络”框架，可优化编码照明模式和高分辨率二维相位重建；与基于模型的方法相比，该框架所需的测量数据大幅减少 [8]。

**当前与未来的挑战**

尽管在许多任务中已达到最先进的性能，但在物理原理和计算框架方面仍有许多挑战有待解决，包括：

**1. 多重散射效应与缺失锥问题**

随着生物样本的折射率对比度、结构复杂度和尺寸增加，多重散射效应会变得显著。测量常受到“缺失锥”问题的影响，无法获取大量轴向空间频率信息。这些因素共同导致三维重建的轴向分辨率较低，且重建精度下降。尽管已开发出用于重建强散射对象的深度学习框架 [2, 4, 9], 但其效果仍然有限。

**2. 可靠的深度学习预测**

另一项主要局限是，训练好的深度学习模型往往无法适应实验变化。为解决这一问题，有人提出了一种基于贝叶斯学习框架的不确定性量化框架 [7], 该框架无需知道真实值，即可评估预测结果的置信度。然而，这类贝叶斯学习框架仍处于起步阶段，还需要大量工作才能提供更可靠的深度学习预测。

**3. 大规模计算**

在基于深度学习的重建中，神经网络的规模通常会随着输入图像的尺寸增大而增大。因此，在不进行过多图像拼接的情况下，重建图像实际可实现的空间带宽积（SBP）受计算机内存限制。相关的计算成本已成为新兴大空间带宽积成像技术的瓶颈，例如用于十亿像素二维相位成像的傅里叶叠层显微术 [7] 以及针对大尺度三维物体的衍射层析成像 [4]。

**应对挑战的科学技术进展**

在此，我们概述若干有望克服上述挑战、进一步推动深度学习在计算相位成像中的基础极限的研究方向。

**1. 先验知识融入**

克服多重散射和缺失锥问题、提高深度学习预测可靠性的总体策略，是将额外的物理知识融入神经网络设计中。在基于仿真的训练中 [2, 4], , 多重散射物理被融入仿真器。在未训练神经网络中 [5, 6], , 成像系统的物理模型在网络训练过程中被融入。在贝叶斯学习中 [7], , 由神经网络学习先验，再用于量化测试阶段的不确定性。还有一些其他网络设计也隐含地考虑了物理学洞见。例如，参考文献 [3] 使用合成网络分别处理低频和高频空间信息。参考文献 [9] 将序贯测量视为动力系统，并通过循环神经网络求解断层重建问题。我们认为，融入多种先验的混合策略（例如多重散射物理、成像模型和实验数据分布）是值得未来研究的方向。

**2. 计算高效框架**

未来还需要进一步发展，以实现适用于大 SBP 成像应用的内存高效计算框架。一种很有前景的解决方案是神经场（又称隐式神经表示），它通过基于坐标的深度网络对对象进行参数化。对象由小型神经网络的参数表示，而非使用全连接层的体素/像素网格。参考文献 [10] 最近展示了利用这一框架进行大规模三维相位恢复的良好结果。我们认为，开发新颖的神经表示以实现高效的信息嵌入，可能是值得探索的大 SBP 重建方向。

**参考文献**

1. Rivenson Y, Zhang Y, Günaydın H, Teng D, Ozcan A. “使用神经网络中的深度学习进行相位恢复和全息图像重建。”《光：科学与应用》 **7**(2):17141–17141, 2018年。 2. Goy A, Rughoobur G, Li S, Arthur K, Akinwande AI, Barbastathis G. “使用深度神经网络对全连接层状对象进行高分辨率有限角度相位层析成像。” *Proc NatlAcad Sci.* **116**(40):19848–19856, 2019年。 3. Deng M, Li S, Goy A, Kang I, Barbastathis G. “学习合成：低光子计数下的稳健相位恢复。”《光：科学与应用》 **9**(1):36, 2020年。 4. Matlock A, Zhu J, and Tian L, “用于强度衍射层析成像的多重散射仿真器训练神经网络。” *Opt. Express* **31**, 4094-4107, 2023 5. Wang F, Bian Y, Wang H, Lyu M, Pedrini G, Osten W, et al. “使用未训练神经网络进行相位成像。”《光：科学与应用》 **9**(1), 77, 2020年。 6. Bostan E, Heckel R, Chen M, Kellman M, Waller L. “深度相位解码器：使用未训练的深度神经网络进行自校准相位显微成像。” *Optica* **7**(6):559–62, 2020年。 7. Xue Y, Cheng S, Li Y, Tian L. “具有不确定性量化功能的可靠的基于深度学习的相位成像。” *Optica* **6**(5), 618–29, 2019年。 8. Kellman MR, Bostan E, Repina NA, Waller L. “基于物理的学习设计：用于定量相位成像的优化编码照明。IEEE Trans Comput Imaging.” **5**(3), 344–53, 2019年。 9. Kang I, Goy A, Barbastathis G. “利用机器学习，从有限角度视图对对象内部进行动态体积重建。”《光：科学与应用》 **10**(1), 74, 2021年。

10. Liu R, Sun Y, Zhu J, Tian L, Kamilov U. "使用神经场从离散仅强度测量中恢复连续三维折射率图。" *Nature Machine Intelligence* **4**(9), 781—791, 2022年。

# 9 — 多模态显微镜图像配准

Nataša Sladoje[1], Joakim Lindblad[1]

1. 信息技术系，乌普萨拉大学，瑞典

## 状态

技术的进步使得人们能够进行信息量极高的成像，让科学家得以观察过去甚至难以想象的事物。生物学和临床前领域广泛采用的各种成像技术，展现了丰富多样的可能性 [1]。强大而复杂的设备能够揭示样品的多种属性，例如形态结构、化学组成、动力学和功能；然而，它们通常一次只能揭示其中一种属性。我们见证了关联多模态成像(CMI)方法日益普及，尤其是在生命科学领域。这些方法结合不同成像模态所提供的互补信息，构建样品的整体综合视图，从而最大限度地提取有关目标对象的信息 [2]。最成熟的关联多模态成像技术是关联光学与电子显微镜 (CLEM)，它结合了亚细胞环境中的空间信息和功能信息。

为实现对不同设备采集的异质信息进行联合分析与融合，首先需要在采集到的图像之间建立精确的几何对应关系，即找到一种空间变换，使同一坐标系中的数据实现最佳对齐。这一过程称为图像配准，传统上采用迭代优化的方式进行，旨在找到能够最大化待对齐图像之间相似性度量的变换。根据应用场景的不同，会使用不同类型的变换（如刚性、仿射、可变形变换），从而使任务受到不同程度的约束。优化过程通常具有高度非凸性，因此复杂且耗时，而且往往只能得到次优解。多模态配准尤其如此：为了捕捉互补信息而需要对齐的图像通常彼此差异很大。

为了解决或规避已观察到的问题，研究人员转而采用基于深度学习（DL）的方法。主要沿着三个方向开展研究：(i) 学习合适的相似性度量；(ii) 直接预测变换，以加快配准过程；(iii) 应用图像到图像（I2I）平移技术，将多模态配准转化为单模态任务。这些方法已在医学数据 [3-5] 上得到评估，其中最成功的方法正日益受到欢迎。然而，它们在生物医学／显微镜图像配准中的应用仍然十分有限。具体而言，基于深度学习的多模态显微镜图像配准仅在少数研究中得到尝试 [6,7]。在图像分割和分类等其他图像分析任务中观察到的显著提升，在此仍未出现——深度学习革命尚未到来，多模态显微镜图像配准领域亦是如此。

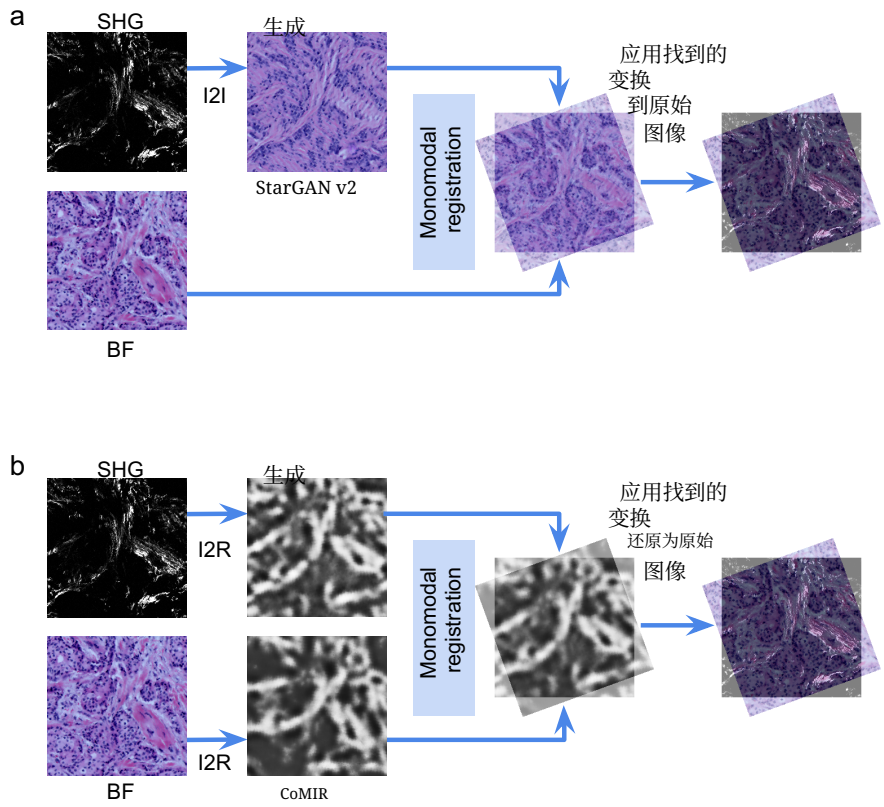


**图9.1 多模态图像配准**。多模态图像配准可以通过将多模态问题转换为一个推测起来更容易处理的单模态问题来解决。这里以一项具有挑战性的任务为例，展示如何配准二次谐波生成（SHG）和明场（BF）显微图像。（**a**）一种方法是将通过一种模态采集的图像合成为另一种模态采集的图像；这种图像到图像（I2I）平移通常通过生成对抗网络实现（这里使用 StarGAN v2）。然而，比较性能分析 [7] 表明，即使合成图像看起来很逼真，其特征似乎仍不够可靠，无法确保后续单模态配准成功。（**b**）另一种方法不是学习图像外观，而是学习多模态图像联合内容的表征（I2R），将其转换为共同的“线上”模态。这种协调表征学习方法结合适当的单模态配准方法，在 SHG 和 BF 图像配准方面取得了优异的性能 [6]。

## 当前与未来的挑战

要充分发挥深度学习在多模态显微镜图像配准中的潜力，研究人员需要应对若干挑战（**图9.2**）：

挑战 *1* —— 深度学习方法在图像配准方面仍未达到预期

考虑到不同的成像模态组合可能需要采用不同的图像相似性度量，从数据中学习此类度量便是顺理成章的想法。在拥有充足的标注训练数据时，所提出的学习型相似性度量表现良好。然而，它们通常只是用来替代缓慢的迭代配准过程中的传统度量，因此其优势难以充分发挥。

深度学习模型经过训练后通常运行速度很快，因此很适合用作回归器，直接预测实现图像对齐所需的变换参数。目前最受欢迎的深度学习配准方法大多采用了这种方法。尽管这种方法显著缩短了运行时间，但在准确性方面仍不及传统迭代方法。

图像到图像转换方法通常基于生成对抗网络，在学习模仿并融合图像数据所捕捉的内容与风格方面表现出色，例如实现无标记组织的“虚拟染色”。然而，生成的图像即使在

外观上令人信服，往往也无法很好地保留对图像对齐至关重要的信息 [7]。协调表征学习方法 [6] 依托对齐图像对，实现了更优的性能（**图9.1**）。

挑战*2*——深度学习方法需要大量数据，但并非任何数据都可以

相关多模态显微术通常只能产生少量大尺寸图像。这与公开可用数据集中收集的数百万张相对较小的标注图像相去甚远；计算机视觉领域最先进的深度学习模型正是利用这些图像进行开发。采集过程复杂，通常需要大量人工劳动；再加上所开展研究的探索性目标，意味着采集到的图像往往屈指可数。迁移学习旨在将已训练的模型应用于新数据集，但面对多样且异质的生物医学图像数据时，往往收效递减。与此同时，超高分辨率成像会产生太字节级（甚至更大）的图像体数据，需要采用先进的算法解决方案进行处理。

挑战*3*——标注的多模态显微数据严重匮乏

为确保性能可靠，深度学习方法通常需要大量标注训练数据。生物医学数据的标注不仅耗时，还需要相当丰富的专业知识，因此收集成本高昂。需要配准图像对进行训练的深度学习模型用途有限，因为对于许多模态组合而言，手动完成配准实在过于困难。少样本方法以及无监督/自监督方法或许能减少对训练数据的需求，但往往要以性能下降为代价。

**应对挑战的科学技术进展**

高质量训练数据的可用性被视为深度学习方法取得成功的必要条件。基于深度学习的多模态显微图像配准所面临的挑战，都与一个需求有关：针对各种成像模态组合，提供数量充足且精准配准的多模态显微图像对，而这并非易事。这表明未来有两个发展方向：

i. 开发只需少量甚至不需要配准图像对便能取得良好性能的方法；ii. 收集大型标注多模态显微数据集，并广泛开放这些数据集。

方法学发展进展

互信息（MI）的迭代最大化仍是最常用的多模态配准方法；它具有普遍适用性，性能尚可，且无需任何训练数据。近期提出的一种基于快速傅里叶变换的算法 [8] 在速度和准确性方面推进了由互信息驱动的刚性多模态配准，并在两个多模态显微数据集上的表现优于基于深度学习的竞争方法。新颖的基于深度学习的配准方法需要取得更大进展。

需要降低甚至消除对大量配准多模态图像对训练数据的要求。我们需要采用新颖且创新的学习策略，以实现高性能、可扩展的解决方案。进一步改进数据高效的深度学习策略，例如少样本学习、域迁移和自监督学习，也将推动多模态显微镜图像配准的发展。

目前已有无需使用任何配准图像对进行训练的无监督方法。例如，基于无监督生成对抗网络的 I2I 平移方法 [7]。不过，这些方法的性能仍需进一步提升。

### 数据收集、开放科学和标准化基准方面的进展

带有标注（真实值）的数据不仅是深度学习模型训练所必需的，也用于评估新方法。因此，汇集并发布高质量数据集至关重要，这有助于进行质量控制并提高可复现性。自动化方法或可减少人工标注的需求，例如，通过分割多模态数据中已识别的共有结构来生成标志点。

集成成像可同时采集不同成像模态的数据，因此这些数据天然对齐；这或许是生成大量高质量真实值配准数据的有效途径，既可用于训练，也可用于性能评估。然而，这种方式仅适用于少数成像模态组合。集成成像的进展也将同时减少对多模态配准方法的需求。

考虑到多模态显微数据集的特殊性和庞大规模，提供合适的数据共享平台是必不可少的。采集流程标准化有助于提高数据质量和同质性（例如，在特定成像模态内），从而提升深度学习模型训练的成效和配准质量。用于标准化方法评估的开放平台将推动新方法的质量提升。近期的一项成果是针对刚性多模态配准方法的开放评估框架，[7]。

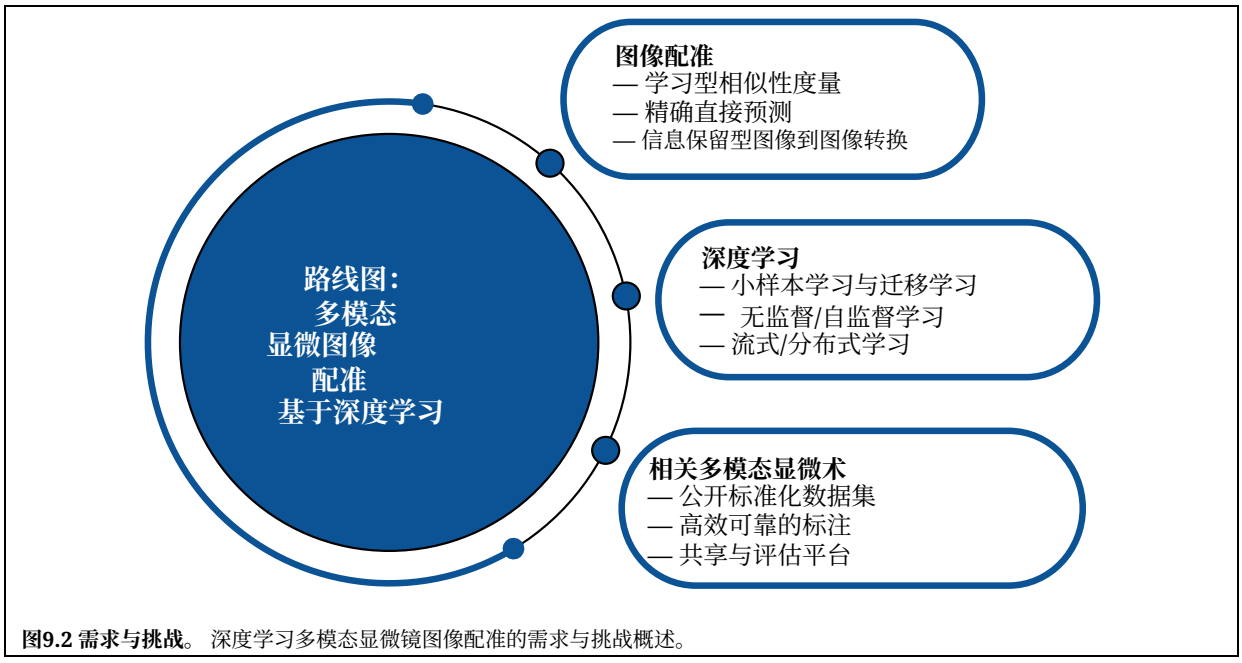


**图9.2 需求与挑战**。 深度学习多模态显微镜图像配准的需求与挑战概述。

## 总结

在深度学习方法表现卓越、持续推动图像数据分析发展的时代，实践中最常用的多模态显微镜图像配准方法仍然依赖半自动方法。eC-CLEM [9] 是一个成功案例——它依赖用户交互，已证明可应用于涉及多种模态组合的配准任务。然而，多模态显微镜图像配准问题日益多样化，所采集数据的规模和维数不断增加，这迫切要求发挥高效数据驱动方法的优势与灵活性，

以推动方法和分析结果的质量迈上新台阶。通过应对该领域已确定的挑战（概述见**图9.2**），基于深度学习的技术有望提供不受模态限制、快速且普遍适用的图像配准解决方案，推动关联多模态成像的发展，并最终造福生命科学。

**致谢**

作者深受*COST*联盟“生命科学中的相关多模态成像”（*COMULIS*）的诸多活动与倡议启发。*COMULIS*是一个合作性的欧洲网络，旨在促进围绕生命科学中关联多模态成像各个方面的跨学科交流与合作。作者获得了*VINNOVA*（*MedTech4Health*项目*2017*年*-02447*）的资金支持。

**参考文献**

1. A. Walter、J.G. Mannheim、C.J. Caruana 编。《生物学与临床前研究成像模态：汇编》，第1卷和第2卷。IOP出版社，2020年。 2. A. Walter、P. Paul-Gilloteaux、B. Plochberger、L. Sefc、P. Verkade、J. G. Mannheim、P. Slezak、A. Unterhuber、M. Marchetti-Deschmann、M. Ogris、K. Bühler、D. Fixler、S. H. Geyer、W.J. Weninger、M. Glösmann、S. Handschuh、T. Wanek。“生命科学中的相关多模态成像：拓展生物医学视野”，《*Front. Phys.*》**8**，47，2020年。 3. Y. Fu、Y. Lei、T. Wang、W.J. Curran、T. Liu、X. Yang，“医学图像配准中的深度学习：综述”，《物理医学与生物学》**65**，20TR01，2020 年。 4. H.R. Boveiri 、 R. Khayami 、 R. Javidan 、 A. Mehdizadeh，“使用深度神经网络进行医学图像配准：全面综述”，《计算机与电气工程》**87**，106767，2020年。 5. G. Haskins、U. Kruger、P. Yan，“医学图像配准中的深度学习：一项调查”。《机器视觉与应用》**31**，8，2020年。 6. N. Pielawski、E. Wetzer、J. Öfverstedt、J. Lu、C. Wählby、J. Lindblad、N. Sladoje，“CoMIR：用于配准的对比式多模态图像表征”，神经信息处理系统进展（*NeurIPS*），33，18433—18444，2020年。 7. J. Lu 、 J. Öfverstedt 、 J. Lindblad 、 N. Sladoje，“ 图像到图像转换是多模态图像配准的灵丹妙药吗？一项比较研究”，《公共科学图书馆·综合》**17**，11，e0276196，2022年。 8. J. Öfverstedt 、 J. Lindblad 、 N. Sladoje，“ 频域中互信息的快速计算及其在全局多模态图像对齐中的应用”，《模式识别快报》**159**，196-203，2022年。 9. P. Paul-Gilloteaux、X. Heiligenstein、M. Belle 等，“eC-CLEM：用于关联显微成像的灵活多维配准软件”，《自然·方法》**14**，102–103，2017年。

# 10 — 荧光寿命成像

Jason T. Smith[1,2], Marien Ochoa[1,3], Margarida Barroso[4], Xavier Intes[1]

1. 伦斯勒理工学院生物医学工程系，美国纽约州特洛伊，12180。2. Elephas，美国威斯康星州麦迪逊，53705，埃德曼广场1号。3. 威斯康星大学麦迪逊分校医学物理系，美国威斯康星州麦迪逊，53705。4. 奥尔巴尼医学院分子与细胞生理学系，美国纽约州奥尔巴尼，12208。

## 状态

荧光寿命成像（FLI）为生物 样品的探测提供了独特的对比机制。FLI 的一项关键优势在于，它能够直接提供与荧光分子状态及其与周围分子微环境相互作用相关的独特绝对测量值，例如温度、酸碱度、黏度、极性和机械力。过去三十年间，FLI 的原理及各种技术实现方式已逐步确立，但直到最近，它通常仍属于专家领域。随着即用型商用 FLI 成像平台的出现，最终用户群体（如分子生物学家、药物开发专家）目前正日益广泛地采用 FLI [1,2]，其在微观 [1] 以及宏观临床前与临床应用 [3] 中的效用也已得到证实。不过，FLI 的一项主要挑战在于估计寿命或相关参数。这是一项复杂的计算任务，其准确性可能高度依赖所选模型、所用参数集以及采集测量值的信噪比（SNR）（这类应用通常处于光子匮乏状态，因此信噪比较低）。因此，人们仍在大力研究稳健、易用且准确的方法，包括用于 FLI 图像形成的深度学习模型。机器学习方法最初被用于 FLI 图像形成时，采用的是人工神经网络（ANN）方法，并取得了令人鼓舞的结果 [4]。随后出现了首个深度学习（DL）模型 FLI-NET，旨在同时生成与双指数模型相关的所有基于寿命参数的二维图像 [5]。FLI-NET 已通过微观和临床前数据集验证，并适用于两种主要的仪器检测技术：时间相关单光子计数（TCSPC）和门控增强型电荷耦合器件。此后，越来越多的研究报告表明，深度学习模型能够在无需用户输入的情况下，对大视场内的寿命参数进行准确估计，推理速度极快（达到或接近实时），且在光子计数较低时性能更佳。基于时空输入开发用于逐像素分类的端到端深度学习模型也日益受到关注。**图10.1** 展示了一个基于人工神经网络、针对大视场进行 FLI 图像形成的示例。

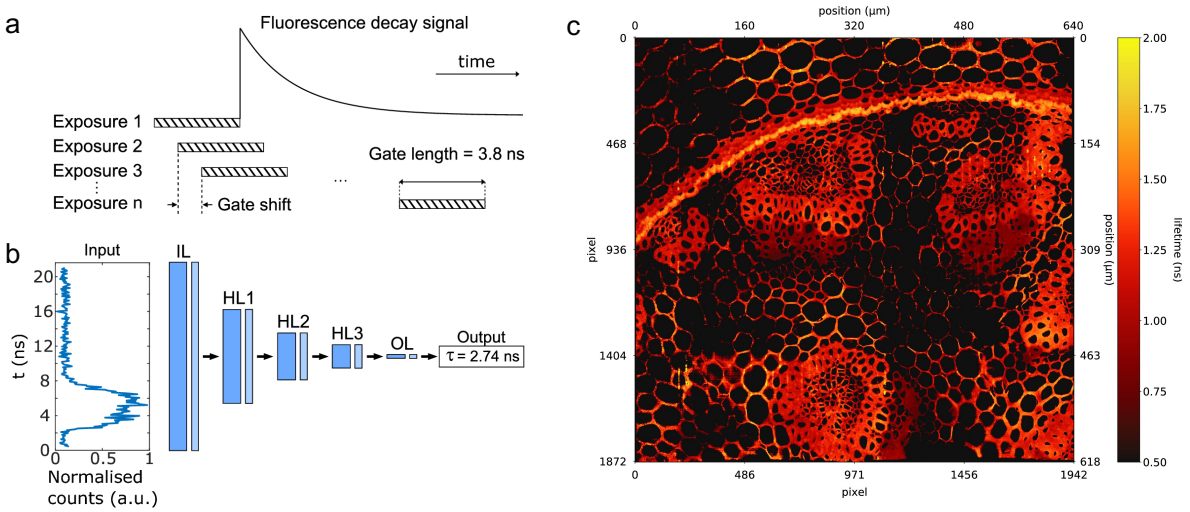


**图10.1 使用人工神经网络进行FLI定量。** 使用经模拟数据训练的人工神经网络进行FLI定量的示意图（a-b）。（c）用于对空间维度较高的Convallaria样品（1875 x 1942像素）进行寿命定量分析的模型示例。人工神经网络的总处理时间约为36 s。转载自参考文献 [6]。

## 当前与未来的挑战

随着用于 FLI 的深度学习（DL）领域不断成熟，该领域正面临当前大规模生物医学成像深度学习模型开发与验证过程中遇到的相同挑战。这些挑战可概括为：大型代表性数据集的采集与可用性、深度学习模型的泛化能力，以及如何使深度学习模型的输出具有可解释性和/或可信度。在许多领域，深度学习取得的广泛成功可归因于计算能力提升与大型数据集易于获取的共同作用。然而，对于生物医学应用，经过严格整理的大型数据集很少向研究群体开放。FLI 尤其如此。迄今为止，已报道的大多数工作都采用具有实验代表性的数据模拟程序，生成大型数据集，以高效地进行深度学习模型训练与验证。这种方法具有成本效益，并已证明能够以较高准确度处理训练期间未使用的实验数据 [15]。这减少了对大型实验数据集进行训练的需求，但仍需要具备专业知识，才能开发出能贴近应用特异性的模拟环境，例如仪器特性（尤其是表征系统时间行为的仪器响应函数 IRF）、基于寿命的参数范围以及噪声分布。

不过，有诸多因素会影响基于实验数据的荧光寿命成像定量，而且在训练阶段很难对这些因素进行模拟。这些因素包括激光器抖动和仪器漂移、样品与探测器之间距离的变化、仪器响应函数的像素相关变化、荧光团的光漂白，以及探测器饱和。其他因素还包括仿真模型偏差，例如，对荧光寿命超出模型训练所用范围的样品进行成像；以及更复杂的信号特征，例如超出双指数行为的多指数特征。这些因素无一例外都可能各自对模型输出产生负面影响。这也凸显了要将所开发的深度学习模型推广到当前成像系统和应用之外的难度。就 FLI-NET 而言，它是唯一应用于不同荧光寿命成像应用和技术的深度学习模型，但仍需针对每种情况对其进行专门训练。与经典迭代拟合方法相比，这会增加计算负担。此外，这也使得评估深度学习模型输出的可信度成为必要。对此，经典的迭代拟合方法能够通过残差评估定量结果的保真度，

也能评估荧光寿命成像数据本身的质量。残差是数据与近似拟合结果之间的差异。这是荧光寿命成像分析中常用的一项重要质量评估手段，因为荧光寿命成像数据中可能包含不适合定量分析的像素衰减曲线，其成因多种多样（例如，信噪比较低、存在运动伪影或参数设置不当）。使用深度学习进行图像形成或分类时，可以通过简单的预处理步骤，在网络推理前移除这些质量较差的衰减曲线，或人为增强它们。然而，这一预处理步骤会妨碍深度学习模型应用于实时场景，和/或可能造成较大的偏差，因为它会强行在数据中引入预期特征，而这些特征并不总是成立（例如，样品中存在更复杂的生物分布时，却假定其呈双指数行为）。迄今为止，尚无将深度学习应用于荧光寿命成像的研究解决这一问题，即如何提供输出可信度的度量。

**应对挑战的科学技术进展**

将深度学习方法用于荧光寿命成像仍是一个新兴领域，有望大幅提升基于寿命的对比度在生物学中的广泛应用，并推动其在转化医学中的应用。迄今为止，一系列开创性研究已为开发面向特定应用和技术的高效深度学习模型奠定了基础。一个重要问题是，在许多情况下，深度学习模型的实验验证主要采用相对明亮、寿命较长的样品，即所谓的“最佳情况”。不过，可以说，目前寿命成像领域面临的最大挑战是如何在高背景噪声水平下进行低光子计数检测。事实上，要在所有像素中获得高质量的衰减曲线，荧光寿命成像数据采集需要大量光子。然而，低计数往往迫使人们采用较长的曝光时间或较高的照明功率，从而可能导致荧光团光漂白或细胞/组织损伤。低计数还会导致分箱增加，进而降低分辨率。然而，对于敏感样品，或要求即使只是适中（即亚秒级）帧率的应用而言，往往无法收集到足够高的计数。只有少数研究报告了在具有挑战性的样品中验证深度学习，例如代谢成像（低光子计数）或短寿命样品（如发射近红外光的荧光团）。近期，新一代时间分辨探测器（如单光子雪崩二极管 SPAD 阵列）有望实现更快速、光子效率更高且信噪比更优的荧光寿命成像数据采集 [7,8]。此外，采用单像素探测等计算成像方法的新一代显微成像系统，将有助于提高收集效率，尤其是在与深度学习模型结合时 [9,16]。另外，采用能利用额外信息内容的探测器（例如高光谱探测配置），将有助于提高特异性；尤其是在目标荧光团的光谱发射因光谱串扰而难以分离的情况下 [10]。此外，目前仍有大量工作致力于开发更稳定、量子效率高且细胞毒性低的外源性荧光团，以改善荧光寿命成像信号检测 [11]。

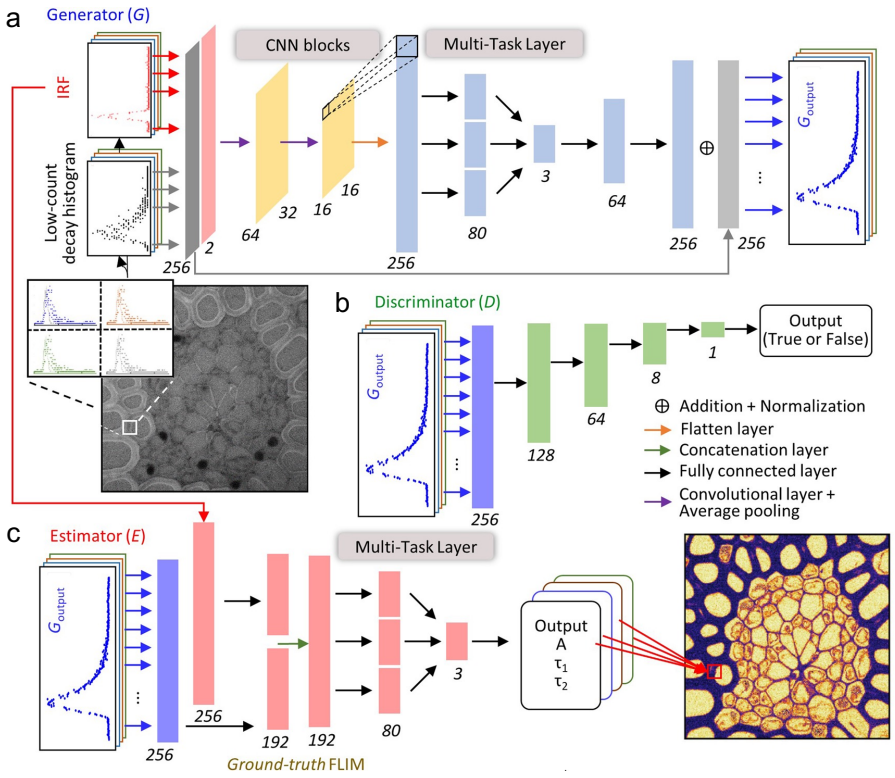


**图10.2 flimGANE（基于生成对抗网络估计的荧光寿命成像）示意图**。生成器 (a) 对低信噪比的荧光衰减曲线输入进行去噪，并考虑潜在的激光器抖动。判别器 (b) 通过附加损失项来确保衰减曲线具有较高质量。随后，估计器 (c) 利用生成器去噪后的输出，获取寿命定量分析结果。转载自参考文献 [12]。

在输出可信度方面，可用于可解释人工智能的工具数量不断增加。不过，尽管现有方法或许可以有效用于荧光寿命成像分类任务，但深度学习图像形成领域仍缺乏适当的工具。迄今为止，深度学习模型的输出必须由专家评估，而意外结果则需要进行取证式调查。根据经验，这些意外的深度学习结果通常归因于实验采集参数的某些变化。采用生成模型可以缓解这类变化。例如，flimGANE 会考虑时间相关单光子计数所采集荧光寿命成像数据中的噪声分布和激光器抖动（**图10。2** [12]）。这进而有助于开发泛化能力更强的深度学习模型。不过，这些模型通常会带来额外的计算复杂度，因此不适用于某些临床场景所需的快速推理。针对这一问题，有研究提出了更简单的深度学习模型，可处理单个像素的数据，并有望直接部署于采集硬件。结合高效的训练方法，这类模型预示着嵌入式硬件实现的发展前景，并可与传感器和读出电路结合，实现快速片上训练与推理 [13]。

最后，为了最大限度地提升 FLI 社区的可复现性和可及性，开发易于使用的开源软件（例如 FLIMJ [14] —— 一款适用于广泛使用的 ImageJ 的插件）将产生巨大而深远的影响。提供一种工作流程，使用户能够对其仪器响应函数（IRF，即探测器特定响应）进行去卷积，并在广泛的参数范围内开展后续数据模拟和模型训练，可为基准测试提供交叉参考平台。再加上机构资助机构要求支持公开可用数据的发布，这将使该领域向计算机科学界开放，从而推动更多进展。

**总结**

荧光寿命成像已稳固确立其作为细胞成像支柱的地位，应用范围涵盖从微观到宏观的平台。然而，FLI 的效用与通过计算方法获得的参数定量分析密切相关，而对专业知识的要求限制了其影响力和广泛应用。深度学习方法有望实现不受用户相关偏差影响的实时荧光寿命成像定量。除了简化并改进数据处理流程，深度学习还将对 FLI 成像方案和成像平台产生重大影响。由于在微弱信号下具有更强的鲁棒性，深度学习有望降低对长积分时间、空间合并和提高照明功率的需求。总的来说，经深度学习增强的 FLI 将更有利于推动从基础生物学到临床实践等领域的应用。

**参考文献**

1. Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A. & Skala, M. C. “荧光寿命成像显微术：仪器设备、分析与应用方面的基础知识和进展。”《生物医学光学杂志》 **25**, 1 2020年。2. Dmitriev, R. I., Intes, X. & Barroso, M. M. “三维生物对象的发光寿命成像。”《细胞科学杂志》 **134**, 1–17, 2021年。3. Smith, J. T., Ochoa, M., Faulkner, D., Haskins, G. & Intes, X. “宏观漫射光学成像中的深度学习。”《生物医学光学杂志》 **27**, 2022年。4. Wu, G., Nowotny, T., Zhang, Y., Yu, H.-Q. & Li, D. D.-U. “用于荧光寿命成像技术的人工神经网络方法。”《光学快报》 **41**, 2561, 2016年。5. Smith, J. T. 等。“通过深度学习对荧光寿命成像进行快速无拟合分析。”《美国国家科学院院刊》 **116**, 24019– 24030, 2019年。6. Zickus, V. 等。“采用百万像素单光子雪崩二极管相机和神经网络寿命估计进行荧光寿命成像。” *Scientific Reports* **10**, 20986, 2020年。7. Bruschini, C., Homulle, H., Antolovic, I. M., Burri, S. & Charbon, E. “生物光子学中的单光子雪崩二极管成像仪：综述与展望。”《光：科学与应用》 **8**, 87, 2019 年。8. Smith, J. 等。“ 体外和体内近红外荧光寿命成像：采用时间门控单光子雪崩二极管相机。” *Optica* **9**, 532—544, 2022年。9. Ochoa, M. 等。“基于高压缩深度学习的体内单像素高光谱宏观荧光寿命成像。”《生物医学光学快报》 **11**, 5401, 2020年。10. S mith, J. T., Ochoa, M. & Intes, X. “UNMIX-ME：通过深度学习进行荧光光谱与寿命解混。”《生物医学光学快报》 **11**, 3857, 2020年。11. Grimm, J. B. 等。“一种针对活细胞和活体成像微调荧光团的通用方法。”《自然·方法》 **14**, 987–994, 2017年。12. Chen, Y.-I. 等。“生成对抗网络可对活细胞中的荧光寿命图像进行快速稳健的分析。”《通讯生物学》 **5**, 18, 2022年。13. Zang, Z. 等。“通过极限学习机快速分析荧光寿命成像。” arXiv 2203.13754, 2022年。14. Gao, D. 等。“FLIMJ：用于荧光寿命图像数据分析的开源 ImageJ 工具包。”《公共科学图书馆·综合》 **15**, e0238327, 2020年。15. N Nizam, M Ochoa, J Smith, S Gao, X Intes, “基于蒙特卡洛的数据生成：用于漫射光学的高效深度学习训练与验证，”《生物医学光学杂志》 **27**(8), 083016, 2022年。

16. M Ochoa、J Smith、S Gao、X Intes，“体外宏观自发荧光的计算寿命成像与浓度解混”，J. Biophoton.，e202200133（2022年）。
https://doi.org/10.1002/jbio.202200133

# 11 — 多模态非线性显微成像

Tong Qiu[1], Li-Yu Yu[1], Sixian You[1]

1. 麻省理工学院电子学研究实验室、电气工程与计算机科学系，美国马萨诸塞州波士顿

## 状态

非线性光学理论与显微镜成像技术的发展，使我们能够以前所未有的方式，以亚微米分辨率实时观察活细胞、组织和动物。在过去二十年中，研究人员利用基于多光子过程激发的荧光、来自特殊结构化分子的谐波产生，以及基于相干拉曼散射的化学分析图像，研究了各种生物学现象。研究表明，整合这些成像模态，可在活体组织环境中对细胞进行代谢、化学和结构分析。尽管前景广阔，多模态非线性显微成像尚未充分发挥其潜力。若要进一步应用于生物医学，还需改进硬件和软件。本文从两个方面探讨深度学习有望弥补的重要不足：1）深度学习如何通过基于深度学习的重建与增强，帮助突破多模态非线性显微成像的技术局限；2）深度学习如何通过基于深度学习的图像和视频理解，提升多模态非线性显微成像的临床与生物学相关性。

## 当前与未来的挑战

非线性显微成像面临的一项挑战，是其长期存在的技术局限，例如活体成像中的穿透深度、成像速度、信号强度和分辨率。近几十年来，人们提出了各种硬件改进方案，包括利用自适应光学、自适应激光源和基于光纤的内窥镜检查实现更深层的组织成像，利用多焦点和宽场时间聚焦提高速度，以及通过脉冲整形增强信号。然而，基于硬件优化其中一项参数，通常会导致其他参数的性能下降。例如，脉冲整形通过补偿色散来提高信号生成效率，但代价是消耗更多激光功率并增加成本。计算重建（例如优化和基于学习的算法）则提供了一种颇具前景的替代方案，可通过基于原理或学习得到的数据先验进行正则化，克服这些固有的权衡。

另一个挑战是对多模态非线性显微成像的图像和视频进行自动化理解。多模态非线性显微成像所捕获的信息，是对荧光团（二光子、三光子吸收荧光）、分子结构（第二、三次谐波产生）和化学键（相干拉曼反斯托克斯散射、受激拉曼散射）进行的像素配准多模态定量测量。尽管信息丰富，但如何将多模态信息转化为生物学和病理学分析，目前仍难以为免疫组织病理学领域的专家——生物学家和临床医生——所用。当前亟需能够应对多模态非线性显微成像图像和视频理解挑战的算法。一种途径是将多模态非线性显微图像直接转换为苏木精-伊红样图像，从而提升新图像数据集的生物医学相关性。Cahill等人展示了一种基于颜色度量的方法，可将非线性显微图像可靠地转换为苏木精-伊红图像 [1]。另一种途径是针对特定应用直接提取定量信息。例如，Walsh等人利用非线性自发荧光的定量特征，对静息和活化T细胞进行了分类和单细胞分析

显微镜成像，揭示了自发荧光特征与T细胞代谢之间的相关性 [2]。这些发现建立了可靠的方案并提出了新的机制，但依赖于用户同时掌握非线性显微成像和特定生物医学应用的专业知识。深度学习方法有望减轻对领域专业知识的依赖，并通过数据驱动和端到端学习进一步简化流程。

**应对挑战的科学技术进展**

如上一节所述，通过恰当的数据先验，计算重建在突破非线性显微成像物理极限方面具有独特优势。例如，为了忠实地重建深层中的宽场多重测量，Zheng 等人 [3] 利用时间聚焦实现随机图案宽场照明，并采用基于物理的反演对多重信号进行计算重建（**图1a**）。为了实现视频速率多光子内窥显微镜技术，Guan 等人 [4] 设计了一种两阶段学习迁移策略，以生成通过体内实验难以获得的增强训练数据集，从而有效弥补高帧率带来的信噪比和分辨率损失（**图1b**）。为实现高速、高保真的高光谱非线性显微成像，Lin 等人 [5] 基于多边形扫描器实现了超快调谐，并通过空谱残差学习网络增强微弱的拉曼信号（**图1c**）。Weigert 等人 [6] 和 McAleer 等人 [7] 展示了利用基于学习的算法，在降低光剂量或采集时间的同时实现高质量图像重建的良好前景。Fan 等人利用深度学习解码器实现了增强的二次谐波成像，从而高效、稳健地进行相位恢复 [8]。尽管这些计算策略有望绕过非线性显微成像的物理局限，但仍有若干问题有待深入研究，包括如何在要求严苛的应用中获取真实值数据、如何避免数据驱动重建中的幻觉，以及如何避免学习辅助的生物学发现和临床诊断中的数据驱动偏差。

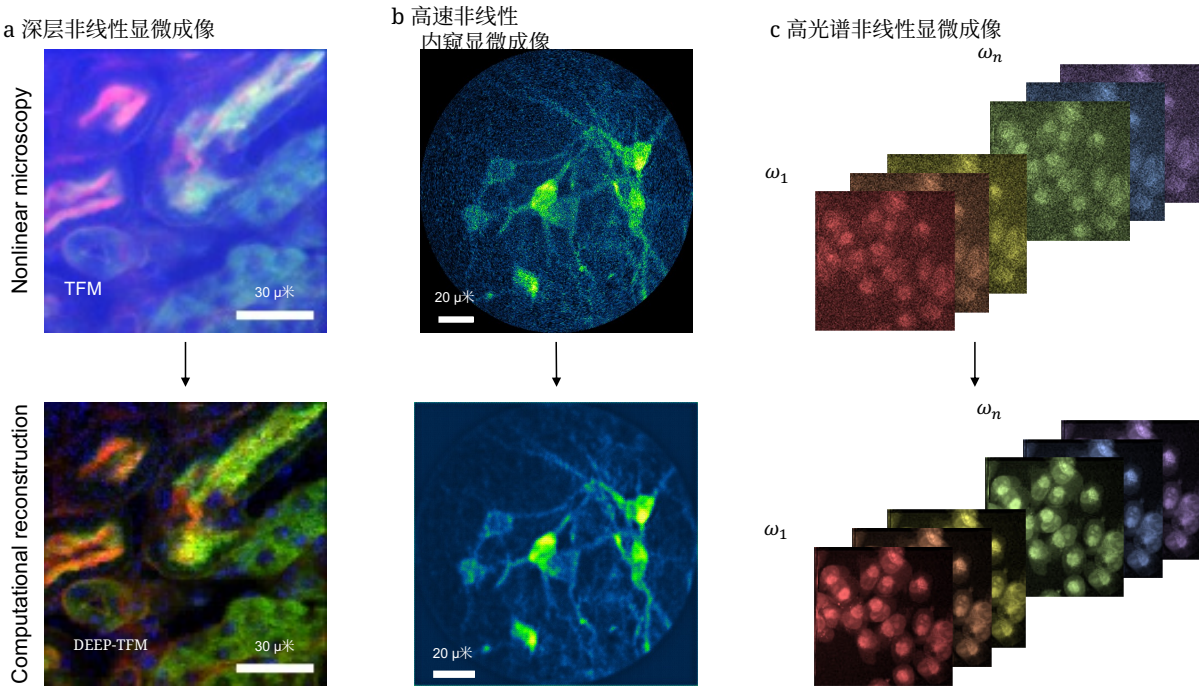


**图11.1 计算重建改善非线性显微成像图像的示例。** **a** 采用图案化照明和计算反演进行深层宽场双光子显微成像，观察离体肌肉组织 [3]。 **b** 使用双光子光纤内窥成像和两阶段学习迁移策略，对自由活动小鼠的神经元进行视频速率活体成像 [4]。 **c** 利用深度学习增强信号，对生物分子进行高速、高保真度的高光谱受激拉曼光谱成像 [5]。

为了更好地理解多模态非线性显微成像中的图像和视频，深度学习是一种很有前景的工具，这得益于其端到端数据驱动原理（即不依赖手工设计特征）以及已展现出的泛化至未见数据的能力。计算机视觉的快速发展为光学显微成像中的众多应用铺平了道路，许多方法也可用于非线性显微成像分析，例如虚拟染色 [9,10], 细胞分割[11], 和癌症分类 [12,13]。例如，为生成类似组织学的图像，Sun 等人 [10]展示了基于 SLAM 图像、分割神经网络和颜色转换指标的虚拟苏木精-伊红染色（**图2a**）。为了对肿瘤微环境进行单细胞分析，You 等人 [11] 使用监督式 U-Net 进行了多类别逐像素分割（**图2b**）。为了实现实时术中评估，Hollon 等人 [12] 展示了基于卷积神经网络的架构，利用受激拉曼组织学图像进行实时肿瘤检测（**图2c**）。尽管这些成果令人鼓舞，许多真实世界的生物医学应用仍面临经过整理且足量的训练数据集稀缺这一问题，这给监督学习带来了重大挑战。为应对这一挑战，Shi 等人 [14] 展示了弱监督学习方法，可从多模态非线性显微成像获得的光学特征中提取常规和非常规癌症生物标志物。尽管这些基于深度学习的方法开辟了广泛的应用前景，未来仍需解决若干挑战。首先，为减少对大量训练数据集的需求，迫切需要弱监督或自监督方法。泛化能力也是一个问题。如何将针对一个数据集训练成熟的方法应用于其他不同的生物医学应用，仍是一项挑战。You 等人 [15] 尝试通过基于物理的数据增强，解决实验室数据与术中数据之间的质量差异问题。还需进一步开发能够轻松适配不同显微成像系统和用户差异的算法。

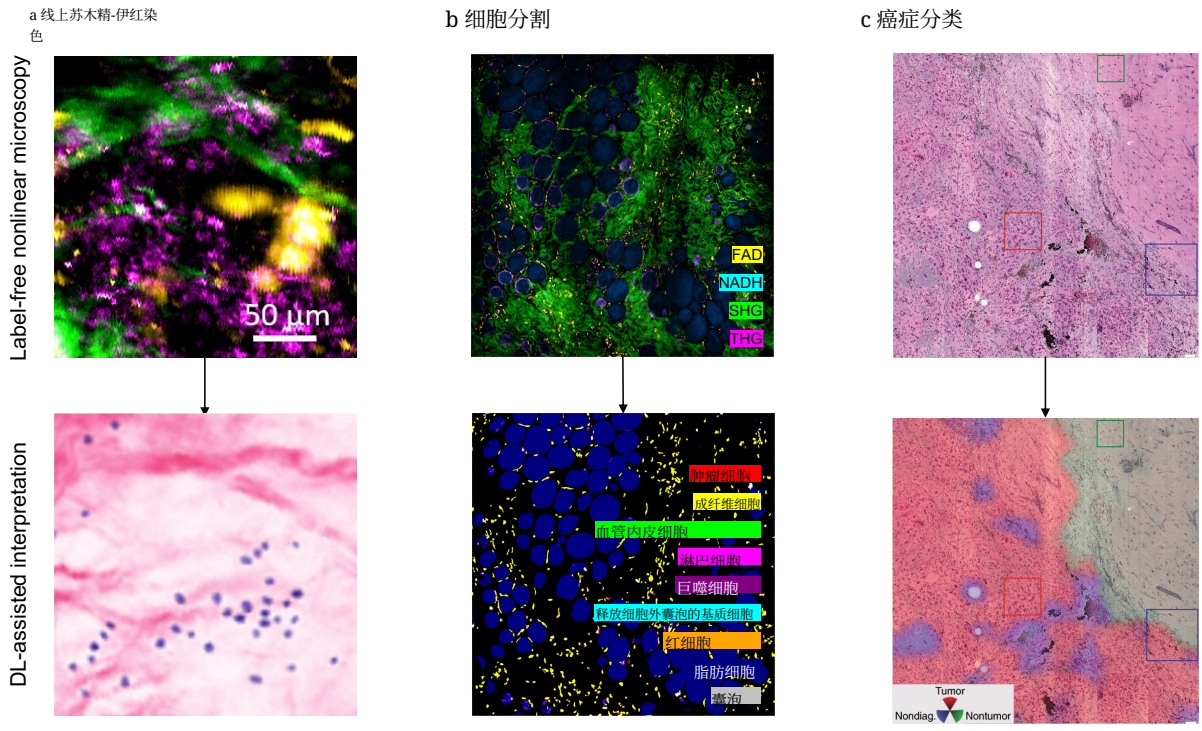


**图11.2 多模态非线性显微成像中深度学习辅助的生物医学成像处理与分析。** **a** 活体大鼠乳腺组织的虚拟苏木精-伊红染色 [10]。**b** 细胞分割及细胞外组织分割，用于表征肿瘤微环境[11]。**c** 基于受激拉曼组织学图像诊断脑肿瘤 [12]。

## 总结

多模态非线性显微成像已成为对活体生物系统进行高分辨率成像不可或缺的工具。深度学习的快速发展已被用于突破多模态非线性显微成像的极限，未来也将继续发挥这一作用。本文着重探讨了深度学习如何助力突破多模态非线性显微成像的技术极限，并提升其生物医学转化价值与影响力。展望未来，我们期待这些努力能够在审慎创新的基础上，加速基于非线性显微成像的临床转化与生物学发现。此外，还将涌现其他令人振奋的研究，展示深度学习如何进一步推动非线性显微成像设计的发展，例如基于学习的成像系统设计，这一方向已在蓬勃发展的计算摄影与显微成像领域得到体现。

## 致谢

*T. Q.*、*L. Y.* 和 *S. Y* 感谢 *Jameel Clinic*、*Scialog RCSA* 奖、*Amazon Research Award* 和麻省理工学院的支持。

## 参考文献

[1] Cahill L C, Giacomelli M G, Yoshitake T, Vardeh H, Faulkner-Jones B E, Connolly J L, Sun C K and Fujimoto J G 2017 使用紧凑型荧光非线性显微镜对乳腺组织标本进行快速虚拟苏木精和伊红组织学检查 *Laboratory Investigation 2018 981* **98** 150 60:–[2] Walsh A J, Mueller K P, Tweed K, Jones I, Walsh C M, Piscopo N J, Niemi N M, Pagliarini D J, Saha K and Skala M C 2020 通过自发荧光寿命成像对T细胞活化进行分类 *Nature Biomedical Engineering* *2020 5 1* **5** 77 88 :– Zheng C, Park J K, Yildirim

[3] M, Boivin J R, Xue Y, Sur M, So P T C and Wadduwage D N 2021 通过激发图案化实现散射介质中的快速宽场成像与去散射 *Science Advances* **7**

[4] Guan H, Li D, Park H cheol, Li A, Yue Y, Gau Y A, Li M J, Bergles D E, Lu H and Li X 2022 用深度学习双光子光纤内窥成像，在自由活动小鼠中实现视频速率脑成像 *NatureCommunications 2022 13:1* **13** 1–9[5] Lin H, Lee H J, Tague, Lugagne J B, Zong C, Deng F, Shin J, Tian L, Wong W, Dunlop M J and Cheng J X 2021 通过超快调谐和空间-光谱学习实现微秒指纹受激拉曼光谱成像 *Nature Communications 2021 12 1* **12** 1 12 :–[6] Weigert M, Schmidt U, Boothe T, Müller A, Dibrov A, Jain A, Wilhelm B, Schmidt D, Broaddus C, Culley S, Rocha-Martins M, Segovia-Miranda F, Norden C, Henriques R, Zerial M, Solimena M, Rink J, Tomancak P, Royer L, Jug F and Myers E W 2018 内容感知图像复原：突破荧光显微镜成像的极限 *Nature Methods 2018 15:12* **15** 1090–7[7] McAleer S, Fast A, Xue Y, Seiler M J, Tang W C, Balu M, Baldi P and Browne A W 2021 深度学习辅助多光子显微镜成像，减少光暴露并加快对光灵敏度高低不同组织的成像 *Translational Vision Science & Technology* **10** 30– 30[8] Fan W, Chen T, Gil E, Zhu S, Yakovlev V, Wang D W and Zhang D 2021 深度学习增强二次谐波成像 *ACS Photonics* **8** 1562–8[9] Rivenson Y, Wang H, Wei Z, de Haan K, Zhang Y, Wu Y, Günaydın H, Zuckerman J E, Chong T, Sisk A E, Westbrook L M, Wallace W D and Ozcan A 2019 通过深度学习对未标记组织自发荧光图像进行虚拟组织学染色 *Nature Biomedical Engineering2019 3:6* **3** 466–77[10] Sun Y, You S, Du X, Spaulding A, George Liu Z, Chaney E J, Spillman D R, Marjanovic M, Tu H and Boppart S A 2020 通过无标记非线性光学显微镜实现实时三维类组织学成像 *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* **10** 2177[11] You S, Chaney E J, Tu H, Sun Y, Sinha S and Boppart S A 2021 肿瘤微环境的无标记深度分析 *Cancer Research* **81** 2534–44[12] Hollon T C, Pandian B, Adapa A R, Urias E, Save A v., Khalsa S S S, Eichberg D G, D'Amico R S, Farooq Z U, Lewis S, Petridis P D, Marie T, Shah A H, Garton H J L, Maher C O, Heth J A, McKean E L, Sullivan S E, Hervey-Jumper S L, Patil P G, Thompson B G, Sagher O, McKhann G M, Komotar R J, Ivan M E, Snuderl M, Otten M L, Johnson T D, Sisti M B, Bruce J N, Muraszko K M, Trautman J, Freudiger C W, Canoll P, Lee H, Camelo-Piragua S and Orringer D A 2020 使用受激拉曼组织学和深度神经网络进行近实时术中脑肿瘤诊断 *Nature Medicine 2020 26:1* **26** 52–8[13] Huttunen M J, Hassan A, McCloskey C W, Fasih S, Upham J, Vanderhyden B C, Boyd R W and Murugkar S 2018 使用深度学习对卵巢组织多光子显微图像进行自动分类 *https://doi.org/10.1117/1.JBO.23.6.066002* **23** 066002[14] Shi J, Tu H, Park J, Marjanovic M, Higham A M, Luckey N N, Cradock K A, Liu Z G and Boppart S A 2022 在无标记虚拟组织病理学中，针对人类乳腺癌相关光学生物标志物发现的弱监督深度学习 *bioRxiv* 2022 05 24 493356 . . . You S, Sun Y, Yang L, Park J, Tu H, Marjanovic M, Sinha S and Boppart S A 2019 通过深度神经网络驱动的多光子虚拟组织学实现实时术中诊断 *npjPrecision Oncology 2019 3:1* **3** 1–8[15]

# 12 — 机器学习驱动的自动化扫描探针显微术

Yongtao Liu[1], Maxim A. Ziatdinov[1,2], Sergei V. Kalinin[3]

1. 纳米相材料科学中心，橡树岭国家实验室，美国田纳西州橡树岭 37830 2. 橡树岭国家实验室计算科学与工程部，美国田纳西州橡树岭 37830 3. 田纳西大学材料科学与工程系，美国田纳西州诺克斯维尔 37996

## 状态

自 Binnig 和 Rohrer 于 35 年前开发出原子力显微术（AFM）以来[1, 2],，扫描探针显微术（SPM）已成为从凝聚态物理学、材料科学到生物学和医学等领域的主流技术[3]。SPM 的高度稳健性催生了多种类型的仪器，可在环境条件、受控气氛、液体和超高真空中运行。探针经过电学、化学和磁性功能化后，SPM 成像模式的范围十分广泛。除了成像之外，许多 SPM 技术还支持多种光谱测量，包括传统 AFM 中的力-距离曲线、扫描隧道显微术（STM）中的电流-电压曲线，以及压电响应力显微术（PFM）等技术中的多种时间和电压光谱[4]。SPM 模式的发展与研发界的重点密不可分：20 世纪 90 年代末磁力显微术的持续增长浪潮由磁性硬盘产业推动；铁电非易失性存储器和隧穿势垒的发展，以及近期二维铁电性的发现，推动了 PFM 的发展；而力-距离测量则为理解生物分子的统计物理学提供了见解。可以认为，材料在能量存储与转换方面的实验研究投入呈指数级增长，将引领未来十年的 SPM 发展。在此，电化学应变显微术（ESM）[5] 等技术可用于探测电池和燃料电池纳米尺度体积内的电化学反应性；而光辅助电学 SPM 则很可能成为探测光伏材料和器件的首选技术。同样，STM 及相关光谱技术将日益成为探索材料原子尺度量子行为的首选方法，并可作为实现单原子操纵和组装原子尺度器件的工具。

## 当前与未来的挑战

尽管扫描探针显微仪器取得了巨大进步，全球的成像模态和实验平台也不断增加，但自 Binnig、Quate 和 Rohrer 的早期工作以来，扫描探针显微镜的基本原理始终未变 [2]。扫描探针显微镜基于探针的连续光栅扫描，从而在均匀的矩形网格点上有效采样探针-表面相互作用。光谱测量既可以由操作者通过逐点点击的方式进行，也可以采用高光谱成像模式，在均匀网格上采集光谱数据。从仪器实现、人的感知和数学分析等角度来看，这种采集模式都很便利。针对高光谱测量，人们已开发出多种基于物理学或数据驱动的方法，将高维光谱数据集转换为一组二维表示 [6]。然而，对于实际材料而言，感兴趣的信息往往集中在少数位置。例如，在生物系统中，沉积在表面的分子通常比它们之间的基底更受关注。在铁电材料中，晶界等结构缺陷或畴壁等拓扑缺陷的功能响应，往往比均匀畴区域中的响应更受关注。这一点尤其

对光谱测量而言十分重要。网格测量往往非常耗时，而且可能造成探针损伤。也许更重要的是，许多光谱测量会因可逆或不可逆过程而影响材料状态，例如使铁电畴壁发生位移、诱发局部电化学反应，或导致材料发生塑性变形。因此，有必要开发成像点密度可变的仪器工作流程，尤其是用于扫描探针显微镜主动实验的方法。在这类实验中，算法会根据同一实验中测量结果，更新图像或光谱测量的位置。在此，我们区分三种自动化实验类型，即：(a) 为标量或多模态测量调整采样（**图12.1a**）；(b) 正向光谱实验，其中实时发现先验已知的感兴趣对象，并进行光谱测量（**图12.1b**）；以及 (c) 逆向实验，其中发现与感兴趣功能行为相对应的空间结构（**图12.1c**）。需要指出的是，虽然 (b) 大致对应人类显微镜专家的操作，但任务 (a) 和 (c) 完全可以由人来执行。

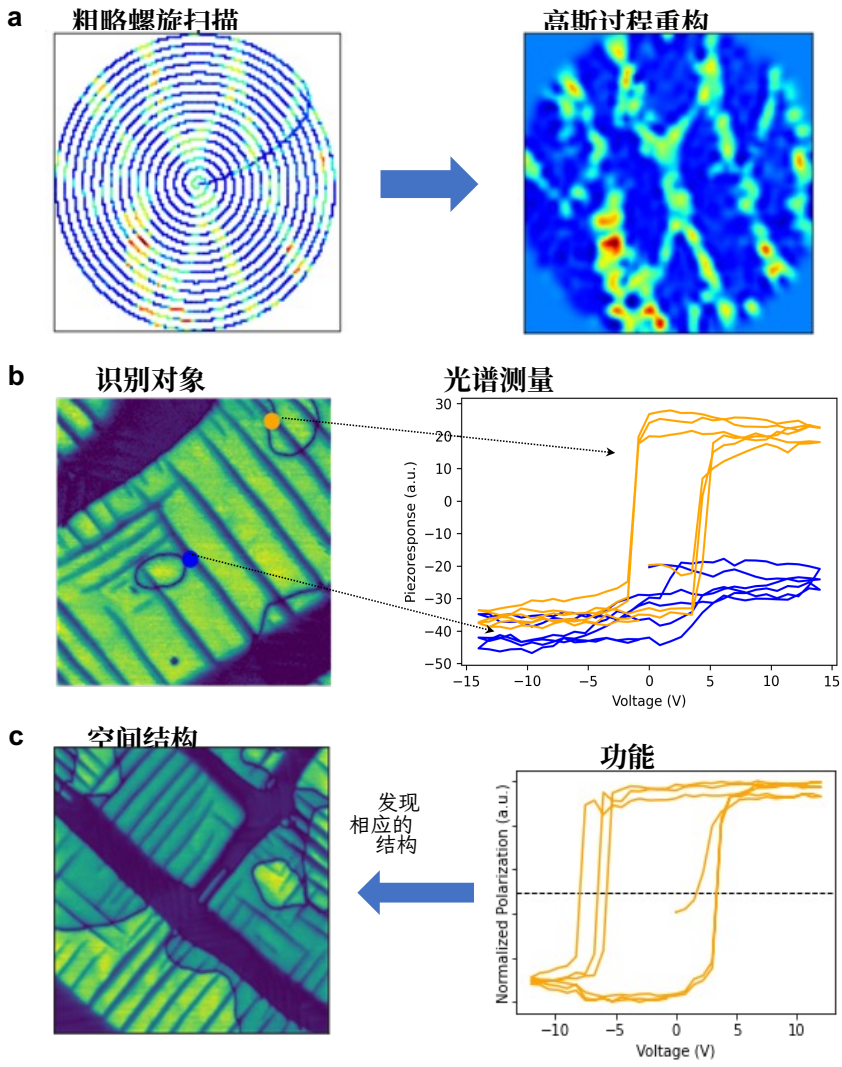


**图12.1 SPM 中的三种自动化实验。(a)** 调整采样与重建，根据采样数据重建完整数据集。经许可改编自参考文献 [7]。**(b)** 正向实验：在图像数据中识别感兴趣对象，然后对已识别的对象进行光谱测量。经许可改编自参考文献 [8]。**(c)** 逆向实验：已知目标功能后，发现相应的结构或材料。经许可改编自参考文献 [9]。

**应对挑战的科学技术进展**

开发自动化实验工作流程需要三个组成部分协同配合，即工程控制（也就是说，算法应能够向显微镜发出控制指令）、机器学习算法，以及奖励函数的定义。前两个组成部分显而易见，而第三个组成部分（奖励）传统上较少受到重视。

然而，显然，即便对于自动驾驶这类应用，如果奖励目标是安全（倾向于极慢行驶）还是时间，所选择的路径也会大不相同。对于物理实验，奖励目标要复杂得多，必须结合具体的物理实验、先验假设等来定义。对于此处的重建问题（a），可采用自适应稀疏采样的变体作为实现算法，例如基于高斯过程的方法。在这种情况下，奖励函数由重建质量与尽量减少采样次数之间的平衡来定义。然而，尽管这些算法起初被认为前景可观，但它们往往只能使采样点数量略微减少（约 2–3 倍），代价则是扫描协议更加复杂。这种表现可归因于图像中存在多重长度尺度

这使得高斯过程核难以有效构建。从更一般的角度来看，SPM 的经典均匀扫描对应于完全开放的先验，因此往往是最优的。实验（b）依赖于预先定义的感兴趣对象，这些对象可通过深度卷积网络实时识别。集成方法和迭代训练方法的出现，使得人们能够应对不可避免的分布外效应（即当显微镜参数发生变化时，训练后的网络识别感兴趣对象的能力）。近期，研究人员将采用整体嵌套边缘检测的深度残差学习框架（ResHedNet）进行集成，以最大限度地减少实时 SPM 测量中的分布外漂移效应 [8]。集成后的 ResHedNet 已在运行中的 SPM 上实现，可将实时压电力显微镜数据流转换为分割后的铁弹性畴壁图像。随后，预先定义的工作流程将发现的畴壁作为光谱测量的坐标。通过这种方式，该方法能够自动、全面地研究畴壁（几乎覆盖畴壁上的所有位置）；相比之下，传统的手动操作只能研究畴壁上有限数量的位置。利用这种方法，研究人员观察到了 $PbTiO_3$ 薄膜中交替出现的高、低极化动态铁弹性畴壁。最后，深度核学习（DKL）方法的出现使得逆向光谱工作流程得以实现。在此，操作者定义使光谱具有研究价值的特征，例如某个特征的强度、光谱形状的特定方面，甚至图像中光谱的最大变异性。换言之，每个采集到的光谱都可以对应一个数值，用来绝对地衡量其“有趣”程度，或与先前采集的光谱进行比较。DKL 算法会学习材料结构中哪些元素能够使该奖励最大化，并据此引导对材料表面的探索。近期，这一 DKL 算法已在 SPM 中实现，用于研究铁电畴结构与极化动力学之间的关系 [9]。DKL 的探索过程及其结果都很有意思。如**图12.2**所示，DKL 探索过程表明畴壁具有研究价值，而 DKL 结果则显示 $180^{o}$ 畴壁具有较高的极化动力学。尽管铁电领域的专家对此早有预期，DKL 本身并不具备任何物理知识，所有信息都是在实验过程中主动学习得到的。

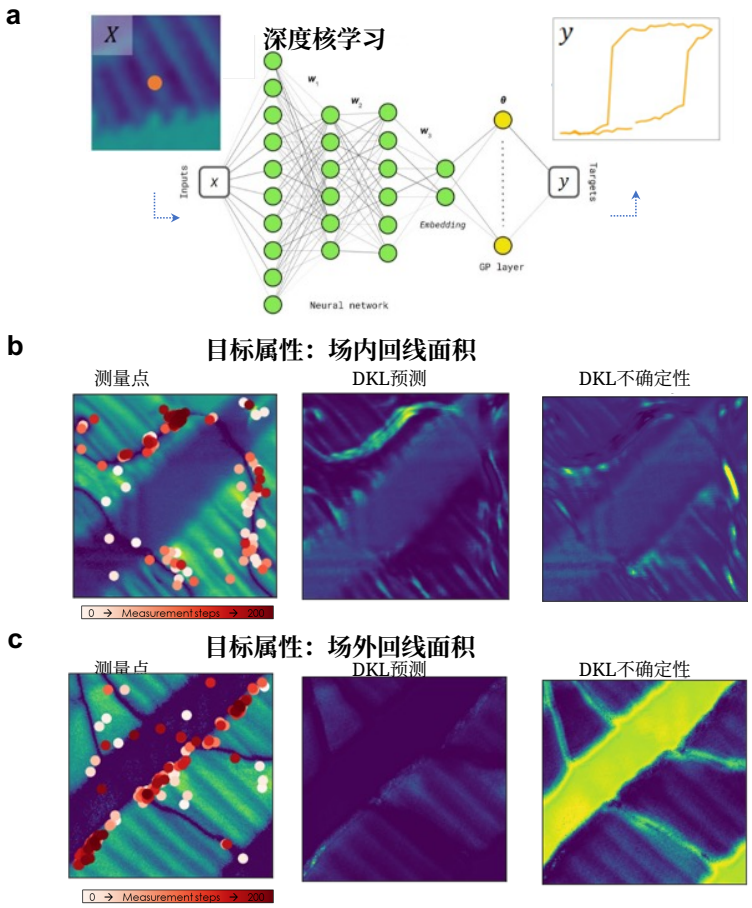


**图12.1 深度核学习压电响应力显微镜（DKL-PFM）。**（**a**）深度核学习结构：它包含一个神经网络，用于将图像数据的属性编码到低维潜在空间中；还包含一个在潜在空间上运行的高斯过程层，用于分析图像数据与光谱数据中编码的目标属性之间的关系。（**b-c**）DKL-PFM 在 $PbTiO_3$ 薄膜上的结果显示，DKL 决定的测量点位于畴壁周围（表明畴壁值得关注），并预测畴壁具有较大的极化动力学。经许可改编自参考文献 [9]。

## 总结

机器学习（ML）方法彻底改变了现代科学的诸多领域，包括计算机视觉与图像生成、医学与生物成像，以及规划与预测。开放代码和数据文化的发展，促使机器学习算法在不同领域间迅速传播。再加上现代显微镜引入了 Python 控制接口，扫描探针显微镜（SPM）领域正迎来一场变革。然而，要充分把握这一机遇，就必须建立领域科学与机器学习之间的联系，包括定义能够引导实验的领域特定奖励，明确不变性并定义应忽略的偏差，以及采用构建这些方法所需的机器学习工具。借助这些方法，自动化实验能够开展传统方法难以实现的实验，因为实验参数可能过于复杂且数量繁多（例如，需要考察的位置或条件过多）。此外，自动化实验也为解决人类难以应对的问题提供了机会，例如逆问题。主动学习方法能够以比传统方法快几个数量级的速度，学习目标功能与材料行为之间的关系。随着机器学习的发展及其与领域科学的结合，自动化实验有望加速材料与物理发现。

**致谢**

这项工作主要由*3D*铁电微电子中心（*3DFeM*）支持。该中心是一个能源前沿研究中心，由美国能源部（*DOE*）科学办公室基础能源科学计划通过资助编号 *DE-SC0021118* 提供经费。部分工作（压电响应力显微术）得到橡树岭国家实验室纳米相材料科学中心（*CNMS*）的支持；该中心是美国能源部科学办公室的用户设施。

**参考文献**

1. G. Binnig 和 H. Rohrer, 《扫描隧道显微镜》。《表面科学》 **126**(1-3), 236— 244, 1983年。2. G. Binnig、C.F. Quate 和 C. Gerber, 《原子力显微镜》。*Physical Review Letters***56**(9), 930, 1986年。3. C. Gerber 和 H.P. Lang, 《纳米世界之门如何开启》。《自然·纳米技术》 **1**(1), 3—5, 2006年。4. Vasudevan, R.K. 等, 《压电响应力显微术中的光谱成像：研究铁电体和多铁性材料极化动力学的新机遇》。《*MRS*通讯》 **2**(3), 61—73, 2012年。5. Balke, N. 等, 《利用纳米级分辨率实空间映射非晶硅负极中的锂离子传输》。*Nano Letters* **10**(9), 3420—3425, 2010年。6. Kannan, R. 等, 《通过物理约束线性解混进行深度数据分析：通用框架、领域示例与社区共享平台》。《先进结构与化学成像》 **4**, 20, 2018年。7. Kelley, K.P. 等, 《通过机器学习实现快速扫描探针显微术：结合压缩感知和高斯过程优化的非矩形扫描》。《*Small*》 **16**(37), 2002878, 2020年。8. Liu, Y. 等, 《实时探索铁电畴壁的物理学：深度学习赋能的扫描探针显微术》。《先进科学》, 202203957, 2022年。9. Liu, Y. 等, 《通过主动学习实验发现铁电材料中的结构–性能关系》。*Nature Machine Intelligence* **4**(4), 341—350, 2022年。

# 13 — 扫描显微图像复原

Arlo Sheridan[1], Uri Manor[1]

1. 索尔克生物研究所，美国加利福尼亚州拉霍亚

## 状态

点扫描成像系统因其用途广泛、易于使用，成为最常用的显微成像模式之一 [1,2]。这些工具对生命科学的发展产生了深远影响，但也需要付出代价。由于很难同时优化成像速度、分辨率和样本保存，总有一个参数会受到牺牲，以换取其他参数的改善（恰如其分地称为“永恒的折中三角”）[2]。例如，缩短像素驻留时间可以提高成像速度并减少样本损伤，但代价是分辨率和信噪比（SNR）降低。纠正这些不足对于推动未来的科学突破至关重要。为应对这些挑战，研究人员开发了基于深度学习的方法，以在图像采集后改善受到负面影响的组成部分。过去几年里，深度学习领域的突破推动了点扫描显微成像模式的去噪和超分辨率发展，其中包括荧光显微镜和电子显微镜。早期方法 [1-3] 主要采用全监督学习，通过对同一样品分别以低质量和高质量成像来获取图像对；而前景可期的半监督方法 [4] 和全无监督方法 [5-7] 也开始展现出具有竞争力的效果，使研究人员得以避免获取配对数据这一技术难度大、成本高昂的过程。优化图像采集是一项成本高昂的工作。基于深度学习的复原和超分辨率不仅为解决“永恒的折中三角”提供了方案，还能大幅缩短成像时间（并降低后续成本），以便开展下游分析所需的实验。为进一步降低这些成本，未来的工作应致力于改进全无监督方法，并理想地将其集成到成像硬件中。此外，还必须确保广大社区能够通过直观、易用且不依赖常驻计算机科学家的软件，方便地使用这些方法。这些进展将减轻研究人员的负担，使他们能够专注于自己的科学问题。

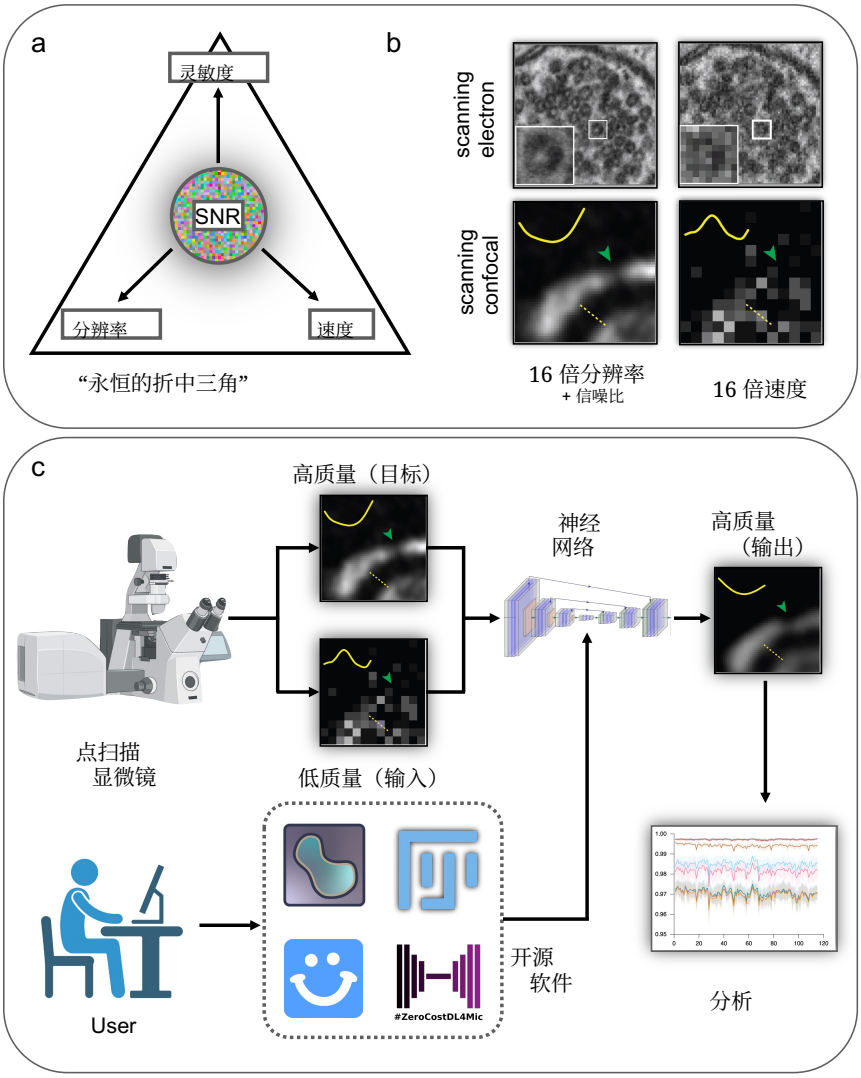


**图13.1 扫描显微图像复原。**（**a**）“永恒的折中三角”展示了优化各个成像组件时必须做出的折中。（**b**）展示扫描电子显微镜（SEM）和共聚焦显微镜数据中成像速度与分辨率/信噪比之间权衡关系的示例（分别对应上排和下排）。（**c**）将深度学习与开源软件相结合、以加速科学发现的示例工作流程概览。显微镜和用户示意图由 BioRender.com 创建。

## 当前与未来的挑战

虽然深度学习方法为克服扫描显微镜成像中的常见缺陷提供了切实可行的方案，但当前方法仍存在若干局限，构成了挑战。全监督方法仍需采集或生成同一样品的高质量和低质量图像对，以创建训练数据 [1,2,3]。这里使用的“质量”一词同时涵盖信噪比（SNR）和/或分辨率。高质量数据通常必须优于训练后网络输出所需达到的质量。获取同一样品的图像对在技术上可能困难、成本高昂，有时甚至无法实现；样品往往只能成像一次 [2]。生成并验证半合成数据（例如，从高质量数据生成低质量数据的“低质化器”，[2]）也需要投入大量精力，而且验证仍依赖同一样品的真实世界图像对。成像和存储高质量数据的高昂成本也给这些数据需求带来阻碍，而该成本与图像分辨率成正比[2]。无监督方法旨在仅凭含噪或低分辨率输入图像实现图像复原，从而解决这一问题。尽管领先方法 [5] 能够生成令人瞩目的重建结果，但它

仍然难以达到全监督或半监督结果的准确度。例如，成功去除逐像素独立噪声，并不一定能去除空间相关（结构化）噪声 [5]。因此，有时无法避免为全监督方法额外付出生成目标数据的工作。此外，图像复原本质上是一个病态问题，即多种不同的高质量图像都可能用于生成同一幅低质量图像，[4,7]。虽然这对于复原照片等常见任务而言并不太令人担忧，但复原科学成像数据可能颇具挑战，因为这类任务对准确度的要求更高。重建结果保真度的任何不一致，都可能对下游分析产生不利影响。例如，超分辨率可用于定量分析以低于通常解析这些结构所需分辨率成像的显微镜数据中的对象。要使这种方法发挥作用，必须对模型进行验证，证明其不会引入错误，导致对这些对象的定量分析不准确[2]。此外，要充分发挥图像复原方法的潜力，就必须通过易于使用的图形用户界面（GUI）让整个社区都能使用这些方法 [8,9]。大多数科学家不具备重新实现深度学习方法所需的专业知识，而运行现成代码往往也需要经历陡峭的学习曲线。然而，要实现满足所有要求的稳健解决方案，并非总是易事。理想情况下，软件应易于打包、分发，并托管在维护良好的平台上。至关重要的是，提供可一键生成模型输出的方法，将极大便利领域专家验证模型输出。验证绝不能仅仅依赖 PSNR 或 SSIM 等基于像素的指标。相反，验证工作流程应结合人类专家的目视检查、多种基于像素的指标，以及最重要的——将实验的最终测量结果与真实值、经验证的数据进行比较。例如，模型输出中生成的感兴趣对象（如突触前囊泡）的数量和尺寸，应尽可能与真实值数据相符 [2]。

**应对挑战的科学技术进展**

尽管全监督方法需要采集高质量数据，但近年来，成像技术标准化和数据存储的发展带来了变革。如今，许多显微成像系统都支持自动采集和图像配准。现在，存储大量数据的成本也大幅降低（例如，在 AWS 上存储一太字节的数据，平均每月费用相对低廉，仅为 20 美元[1]）。随着成像数据集得到更广泛的共享，生成学习型降质器或许切实可行，从而能够快速训练新的监督模型。不过，理想情况下，无监督方法更值得采用。尽管存在上述挑战，如今的去噪方法除了能处理像素级噪声，也能处理结构化噪声；近期结果表明，其准确度可达到与全监督方法相当的水平。用于超分辨率的自监督和无监督方法也在迅速发展[10]。此外，有些方法如今可以提供一组复原结果的分布，而非单一输出[7]。这对求解可能存在多个解的逆问题具有重要的实际意义。理论上，这应当能让用户根据额外的上下文，在不同区域选择不同的解。例如，如果图像的一个角落比中心噪声大得多，那么单一解可能在中心区域效果不错，在角落却效果不佳。在这种情况下，提供一系列可供用户选择的解更为可取。只有让不同背景的广大用户都能使用这些进展，才能充分发挥其影响。为了满足广泛社群的需求，必须提供具有直观用户界面并能持续获得支持的平台。在过去的

[1] https://aws.amazon.com/s3/pricing/

这些年来，FIJI/ImageJ[2]（*金标准*）让科学家能够在数据上运用各种图像分析技术。Napari[3], 、ImJoy[4], 和ZerocostDL4mic[8] 等新一代工具，旨在进一步提升易用性，并通过整合深度学习方法来增强功能。这些工具以及许多其他工具[9] 将使用户能够以往因缺乏足够专业知识而无法实现的方式分析数据。

**总结**

生物成像正以指数级加快的步伐不断发展。随着通过点扫描显微镜系统采集大量图像变得越来越容易，准确、高效地分析由此产生的数据的需求也日益增长。由于图像采集给优化“永恒的折中三角”带来了挑战，深度学习方法为图像复原提供了令人振奋的解决方案。鉴于这些逆问题难以求解，理想的解决方案需要能够应对数据歧义，并尽可能减轻研究人员收集和存储高质量目标数据的负担。此外，还应努力确保不同科学领域的广大用户都能使用这些方法。随着近期深度学习方法的发展，以及致力于开发开源软件和数据集的社区不断壮大，显然这一领域正朝着正确的方向发展。

**致谢**

*Arlo Sheridan* 和 *Uri Manor* 获得 *Waitt*基金会、核心资助申请 *NCI CCSG*（加利福尼亚州*014195*）、美国国立卫生研究院（*R21 DC018237*）、美国国家科学基金会 *NeuroNex* 奖（*2014862*）以及陈-扎克伯格倡议成像科学家奖的支持。

**参考文献**

1. M. Weigert 等，“内容感知图像复原：突破荧光显微镜成像的极限”，《自然·方法》**15**(12), 1090–1097, 2018年。2. L. Fang 等，“基于深度学习的点扫描超分辨率成像”，《自然·方法》**18**(4), 406–416, 2021年。3. T.-O. Buchholz、A. Krull、R. Shahidi、G. Pigino、G. Jékely 和 F. Jug，“第13章——电子显微镜的内容感知图像复原”，载于《细胞生物学方法》，第152卷，T. Müller-Reichert 和 G. Pigino 编。学术出版社，2019年，第277–289页。doi: 10.1016/bs.mcb.2019.05.001。4. J. Johnson、A. Alahi 和 L. Fei-Fei，“实时风格迁移与超分辨率的感知损失”。arXiv，2016年3月26日。doi: 10.48550/arXiv.1603.08155。5. A. Krull、T.-O. Buchholz 和 F. Jug，“Noise2Void——从单张噪声图像中学习去噪”。arXiv，2019年4月5日。doi: 10.48550/arXiv.1811.10980。6. C. Broaddus、A. Krull、M. Weigert、U. Schmidt 和 G. Myers，“使用自监督盲点网络去除结构化噪声”，载于*2020*年*IEEE*第*17*届生物医学成像国际研讨会（*ISBI*），2020年4月，第159–163页。doi: 10.1109/ISBI45749.2020.9098336。7. M. Prakash、M. Delbracio、P. Milanfar 和 F. Jug，“可解释的无监督多样性去噪与伪影去除”，发表于国际学习表征会议，2022年2月。访问日期：2022年11月1日。[在线]。

[2] https://imagej.net/software/fiji/ [3] https://napari.org [4] https://imjoy.io

8. L. von Chamier 等，“借助 ZeroCostDL4Mic 推动显微镜成像深度学习普及”，《自然·通讯》 **12**(1), 2021年，doi: 10.1038/s41467-021-22518-0。9. S. Prigent、C. A. Valades-Cruz、L. Leconte、L. Maury、J. Salamero 和 C. Kervrann，“BioImageIT：用于整合图像数据管理与分析的开源框架”，《自然·方法》 **19**(11), 2022年，doi: 10.1038/s41592-022-01642-9。10. A. Lugmayr、M. Danelljan 和 R. Timofte，“面向真实世界超分辨率的无监督学习”。arXiv，2019年9月20日。doi: 10.48550/arXiv.1909.09629。

# 14 — 单分子定位

Elias Nehme[1,2], Ofri Goldenberg[2], Yoav Shechtman[2]

1. 电气与计算机工程系，Technion – IIT，以色列 2. 生物医学工程系及Lorry I. Lokey生命科学与工程跨学科中心，Technion – IIT，以色列

## 状态

传统显微镜的空间分辨率从根本上受限于衍射极限，约为光波长的一半；在可见光范围内，这实际上相当于 200–300 nm。为克服这一限制，人们开发了多种超分辨率显微镜技术，包括结构光照明显微术、受激发射损耗（STED）以及单分子定位显微术（SMLM）[1], , 本文重点讨论后者。SMLM 的主要工作原理依赖于时空权衡：它不是对荧光样品拍摄单张图像，而是采集一段由许多帧（通常为数千帧）组成的影片，其中荧光团随时间闪烁。在每一帧中，只有一组稀疏、随机 的 荧光团被激活，其位置通过计算确定。实现闪烁有多种化学和物理机制，也因此产生了大量相关缩写，其中最著名的有 PALM、STORM 和 PAINT [1]；然而，不同变体的后续分析过程相似。数据采集完成后，将得到的定位点通过数值方法组合，生成单张计算所得的超分辨图像，通常可使分辨率提升一个数量级（**图14.1**）。

SMLM 彻底改变了生物学研究，使人们能够对生物结构进行纳米尺度成像并追踪单颗粒 [2], , 因此其先驱者于 2014 年获得了诺贝尔化学奖。与电子显微镜等其他高分辨率成像模态相比，SMLM 兼具荧光显微镜的高特异性和高信噪比，并能对活细胞成像。

SMLM 带来的分辨率大幅提升，也带来了独特的实验和算法挑战。以时间换空间的主要问题体现在每帧发射体的稀疏性约束上：这牺牲了时间分辨率，严格限制了对动态过程进行成像的能力。当我们希望感知成像样品越来越多的物理属性（例如深度（三维）、颜色信息和分子取向）时，这一问题会变得更加突出。

近年来，深度学习（DL）在应对其中一些挑战方面取得了巨大成功 [3]。特别是，基于深度学习的端到端优化（E2E）通过联合设计传感器和算法 [4,5,6] , 推动了强大的任务驱动的实验设计，显著突破了定位显微术中时空权衡的局限（**图14.2**）。这类设计已开始应用于科学研究 [7,8]；然而，要使这些方法完全成熟，并被生物学研究群体广泛采用，仍有许多工作要做。具体而言，应致力于增强单分子定位显微术（SMLM）算法在各种实验条件下的稳健性，并为终端用户提供易于使用的软件包 [9]。

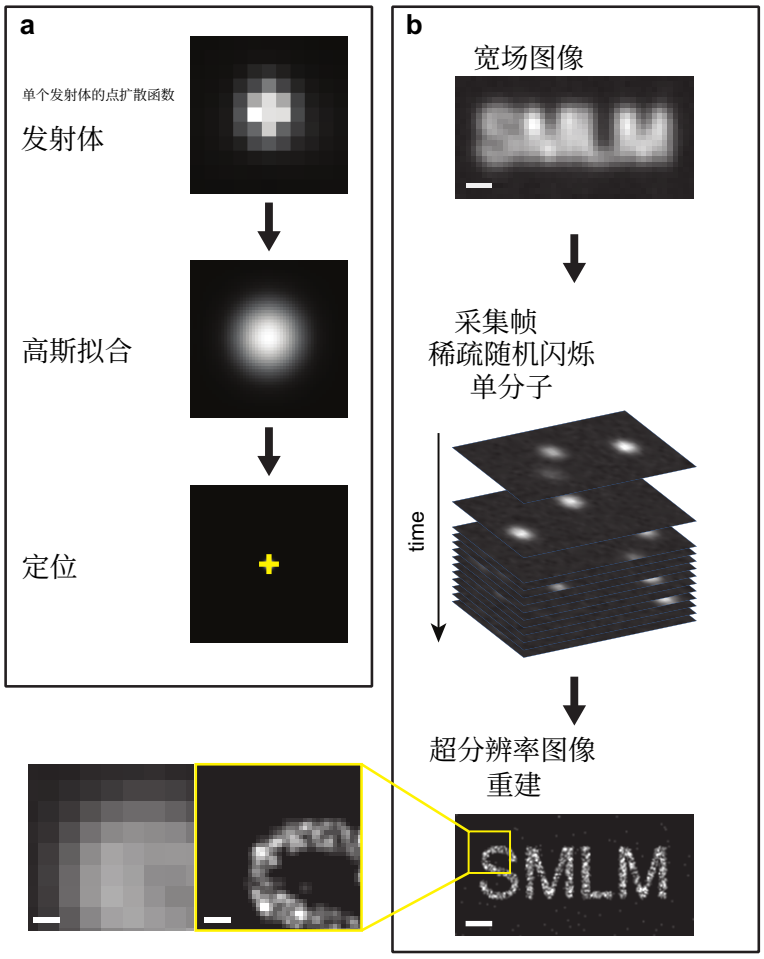


**图14。 1 单分子定位方案。**（a）通过拟合点扩散函数模型计算单个发射体位置。（b）单分子定位显微术实验流程。Scale 标尺 = 0.4 μm（插图标尺 = 0.1 μm）。

## 当前与未来的挑战

在此，我们概述了提升单分子定位显微术（SMLM）能力和易用性所需解决的四项主要挑战：

1. **提高时空分辨率**。要使用单分子定位显微术对快速动态过程进行高分辨率成像，需要提高其时间分辨率。提升时空分辨率的诀窍，是用实验时间换取包含复杂图案的信息丰富的图像数据。随后，需要通过强大算法分析这些数据，以提取底层物理信息。例如，在单分子定位显微术中，放宽发射体稀疏性约束以提高时间分辨率，需要借助能够处理点扩散函数（PSFs）重叠的近邻发射体的图像处理算法[10,11]。

2. **提升信息提取能力**。我们往往需要超越发射体的二维位置来获取信息。例如，通过用不同的荧光发射体标记不同的靶标（如蛋白质），我们可以捕获反映物种间关系的相关信息。在这种情况下，一个典型的挑战是根据采集到的点扩散函数对每个发射体的颜色进行分类；这些点扩散函数通常由光子灵敏度高、但光谱灵敏度低（灰度）的探测器采集。另一个值得关注的物理属性是发射体深度；由于生物结构是三维的，通过观察其三维组织结构（三维单分子定位显微术），我们可以获得重要见解。

3. **最优信息采集**。单分子定位显微术中的成像系统通常通过基于物理直觉的启发式方法或量化信息含量的数学指标（例如 Fisher信息）进行优化。然而，这些方法在适应具有挑战性的实验条件方面仍然有限，而且难以推广到需要联合采集多种物理属性的系统。因此，优化采集方案的设计是释放单分子定位显微术全部潜力的关键。

4. **提高算法的可靠性**。深度学习算法功能极其强大，在解决逆问题方面带来了性能上的飞跃。然而，人们对其内部工作机制及失效模式知之甚少。具体而言，对于单分子定位显微术，我们需要样本自适应自调谐算法，使其能够应对任意实验条件，而无需进行大量校准。更重要的是，在生物学研究这类期望算法推动科学发现的领域，我们需要能够量化重建结果中的不确定性和偏差 [11]。目前，深度学习算法很难“知道自己何时不知道”，我们预计未来将在这方面开展大量工作，以提高其可靠性。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习已被证明在应对超分辨率显微镜成像中的若干基础挑战方面非常成功 [3]。深度学习尤其适用于单分子定位显微术，因为利用基于物理模型的精确模拟器，可以轻松生成大规模配对训练集，而训练集正是监督学习的主要瓶颈。文献 [10] 首次介绍了深度学习在二维单分子定位显微镜中的应用。作者提出了一种深度学习算法，能够重建点扩散函数相互重叠的高密度发射体，并表明该算法可将采集时间大幅缩短至数百帧。之后，文献 [7] 采用了类似策略，用于追踪活细胞中的染色质动力学。同期的研究提出了内容感知策略，以提高时间分辨率 [12], ，甚至将所需帧数减少至单张图像 [13]。类似地，深度学习也被用于从灰度二维测量中感知额外的物理属性，例如颜色分类 [4,14] ，以及利用工程化点扩散函数从高密度数据中进行深度估计 [5,11,15]。

深度学习在单分子定位显微术中的一个尤为有前景的应用，是能够针对当前任务定制采集方案。具体而言，将物理采集系统与数据处理算法进行端到端优化，前景广阔 [4,5,6]。端到端优化既能充分发挥现有硬件的潜力，也能以任务为导向利用新硬件。采集与重建之间的协同，使我们能够设计复杂得多的传感范式，充分利用光子，并采用强大的基于深度学习的重建算法。深度学习最初是为逼近难以通过数学方式定义的函数而发明的，光学仪器设计也不例外。近期研究表明，端到端优化可以扩展至多种传感器设计 [6,16], ，以更复杂的光学装置为代价，获得更高的时间分辨率。

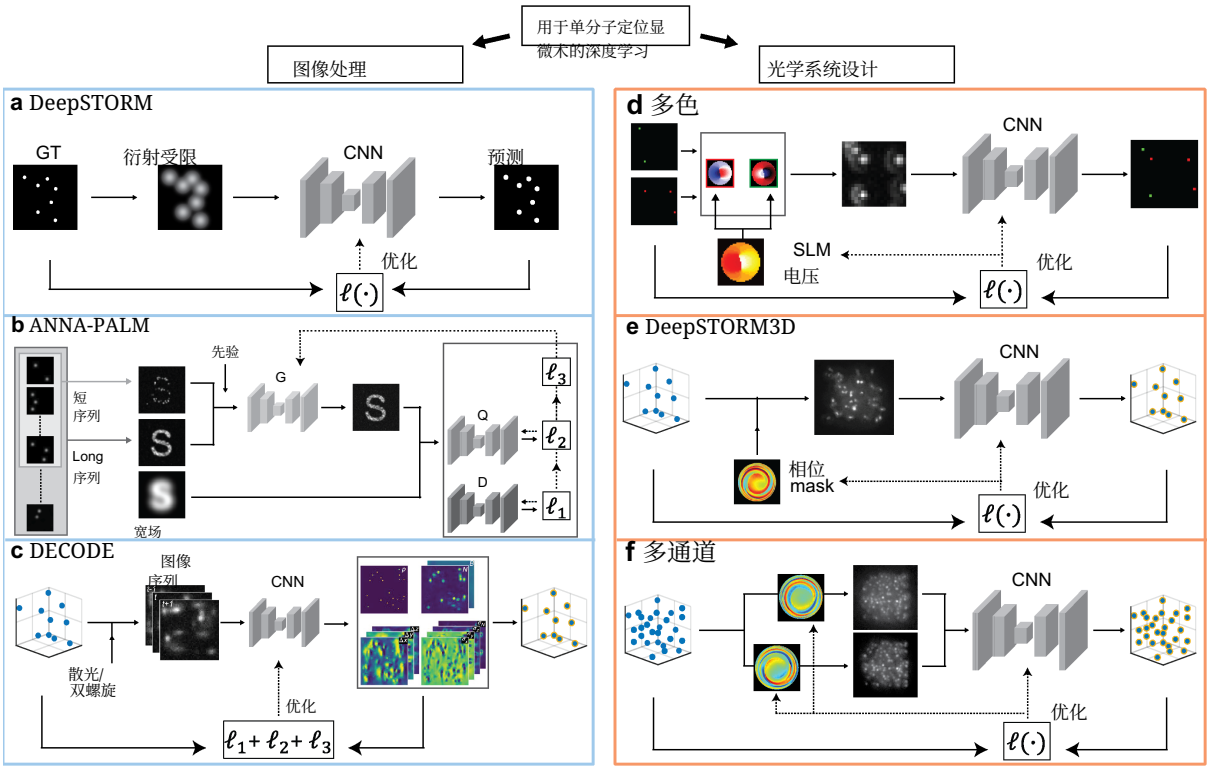


**图14.2 深度学习在单分子定位显微术中的应用。** **(a)** DeepSTORM [10], 一种神经网络，可从原始随机光学重建显微术帧中快速、精确地重建超分辨率图像。**(b)** ANNA-PALM [12], 一种神经网络，可根据少量帧插值生成超分辨率光活化定位显微术重建图像。**(c)** DECODE [11], 一种用于三维密集分子定位的神经网络，可输出检测概率图、亚像素坐标及其不确定性、亮度和背景。改编自参考文献 [11]。**(d)** 多色定位与分类 [4], 通过端到端学习神经网络和色度依赖型工程化点扩散函数，根据灰度测量对多色分子进行定位和分类。**(e)** DeepSTORM3D [5], 通过端到端学习神经网络和工程化点扩散函数，实现密集三维定位。**(f)** 多通道 [6], 通过端到端学习包含两个工程化点扩散函数的分叉光学系统及神经网络，实现超密集三维定位。改编自参考文献 [11]。

## 总结

单分子定位显微术是生物成像中的一种强大工具，其新应用正不断涌现。将单分子定位显微术与深度学习相结合，能够高效地进行分析和系统设计，从而获取信息丰富的成像数据。由于端到端设计的特点，要充分发挥现有传感器和计算能力的潜力，这一跨学科领域需要实验人员与数据科学家紧密合作。迄今为止，研究重点主要在于改进重建算法 [17]；不过，我们预计将会有越来越多的应用涌现，在这些应用中，采集系统与算法将进行联合设计。此外，新传感器和硬件的开发将推动基于深度学习的新型最优采集系统设计。无论如何，都需要标准化指标来评估基于深度学习的单分子定位显微术算法的性能、可复现性和可靠性。最后，在将现有工具用于科学发现之前，必须谨慎行事并解决不确定性量化问题；对于假定待恢复对象具有强先验信息的方法，这一点尤为重要。

## 致谢

本研究得到 *H2020* 欧洲研究委员会“地平线*2020*”（*802567*）和以色列科学基金会（资助编号：*450/18*）的支持。

## 参考文献

1. M. Lelek 等人，“单分子定位显微术”，《自然评论：方法入门》 **1**(1)，2021年 .

2. A. Von Diezmann、Y. Shechtman 和 W. E. Moerner，“用于超分辨率成像和单粒子跟踪的单分子三维定位”，《化学评论》 **117**(11)，7244–7275，2017年。3. L. Möckl、A. R. Roy 和 W. E. Moerner，“单分子显微术中的深度学习：基础、注意事项与最新进展 [特邀],”《生物医学光学快报》 **11**(3)，1633，2020年。4. E. Hershko、L. E. Weiss、T. Michaeli 和 Y. Shechtman，“ 利用深度学习实现多色定位显微术和点扩散函数工程 ”，*Opt. Express*，2019年。5. E. Nehme 等人，“DeepSTORM3D：利用深度学习实现密集三维定位显微术和点扩散函数设计”，《自然·方法》，2020年。6. E. Nehme 等人，“面向多通道成像的最优波前整形学习”，《*IEEE*模式分析与机器智能汇刊》 **43**(7)，2179–2192，2021年。7. R. Barth、G. Fourel 和 H. A. Shaban，“动力学是基因组纳米尺度组织的成因”，细胞核 **11**(1)，83–98，2020年。8. T. Naor 等人，“通过活细胞三维跟踪量化间期细胞周期依赖性染色质动态”，《*iScience*》 **25**(5)，104197，2022年。9. L. von Chamier 等人，“借助 ZeroCostDL4Mic 推动显微镜成像深度学习普及”，《自然·通讯》 **12**(1)，1–18，2021年。10. E. Nehme、L. E. Weiss、T. Michaeli 和 Y. Shechtman，“Deep-STORM：利用深度学习实现超分辨率单分子显微术”，*Optica* **5**(4)，458，2018年。11. A. Speiser 等人，“深度学习实现快速、密集且高精度的单分子定位”，《自然·方法》 **18**(9)，1082–1090，2021年。12. W. Ouyang、A. Aristov、M. Lelek、X. Hao 和 C. Zimmer，“深度学习大幅加速超分辨率定位显微术”，《自然·生物技术》 **36**(5)，460–468，2018年。13. M. Weigert 等人，“内容感知图像复原：突破荧光显微镜成像的极限”，《自然·方法》 **15**(12)，1090–1097，2018年。14. T. Kim、S. Moon 和 K. Xu，“通过机器学习实现信息丰富型定位显微术”，《自然·通讯》 **10**(1)，1–8，2019年。15. N. Boyd、E. Jonas、H. P. Babcock 和 B. Recht，“DeepLoco：利用神经网络进行快速三维定位显微成像”，*bioRxiv* 267096，2018年。16. H. Ikoma、T. Kudo、Y. Peng、M. Broxton 和 G. Wetzstein，“利用光电混合计算进行深度学习多次曝光三维定位显微术”，《光学快报》 第46卷(24)，6023，2021年。17. D. Sage 等人，“超分辨率格斗俱乐部：二维和三维单分子定位显微软件评估”，《自然·方法》 **16**(5)，387–395，2019年。

# 15 — 纳流体散射显微术

Henrik K. Moberg[1], Christoph Langhammer[1], Barbora Špačková[2]

1. 查尔姆斯理工大学物理系；瑞典哥德堡 2. 捷克科学院物理研究所光学与生物物理系统系；捷克共和国布拉格

## 现状

近年来，纳米生物学、单分子生物化学和生物物理学等新兴科学领域迅速发展。由此获得了大量信息，这些信息无法通过传统的系综平均测量和显微工具预见。与此同时，单分子成像方法长期以来依赖荧光标记[1]。这种标记方式需要将发光基团化学连接到目标生物分子上，而这可能会改变它们的自然状态，进而影响其生物活性和功能。这一缺点推动了无标记光学显微方法的发展。在这些技术中，干涉散射显微术（iSCAT）已成功用于对单个生物分子进行成像和分析的诸多应用[2]。然而，这些研究仅限于附着在表面的生物分子，无法揭示它们在溶液中的自然扩散运动。

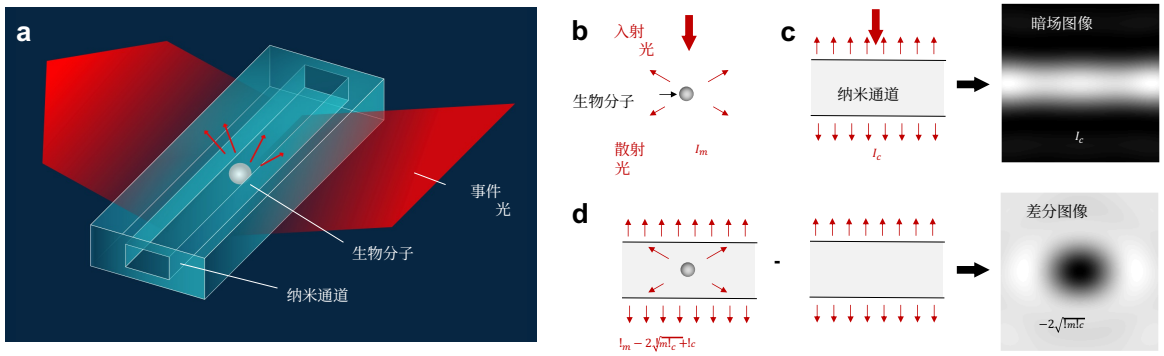


**图15.1 NSM 的原理**。（**a**）实验配置示意图：可见光照射到内部含有生物分子的纳米通道上，系统散射的光以暗场配置收集。（**b**）单个生物分子散射光的示意图。（c）纳米通道散射光及相应暗场图像的示意图。（**d**）内部含有单个生物分子的纳米通道散射光的示意图，以及相应的差分暗场图像；该图像通过从含有生物分子的纳米通道图像中减去空纳米通道图像获得。改编自参考文献 [3]。

为此，我们最近推出了纳流体散射显微术（NSM）[3],，其独特的基本原理使其能够绕过这些限制：NSM 可以对自由运动中的单个生物分子进行成像，无需任何标记。这种工具依赖于纳米流体通道与其中纳米物体（例如生物分子）散射光之间的干涉

**(图15.1)**。为快速、准确地分析记录的图像，我们采用了基于深度学习的计算机视觉（CV）流程，该流程由三种卷积神经网络（CNN）架构组成（**图15.2**）。在参考文献 [3], 中，该流程用于识别并表征多种生物纳米颗粒，范围从细胞外囊泡到DNA分子，还包括分子量低至数十千道尔顿范围的蛋白质。具体而言，对于一张随时间记录纳米通道内数种生物分子散射光的图像（称为“运动图”），计算机视觉流程会输出每种生物分子的轨迹及其两个关键特征——分子量（分子量）和流体动力学半径（$R_S$）。

之所以能够测定这些特征，是因为分子量（分子量）与分子的积分光学对比度（*iOC*）成正比，而$R_S$与扩散率（*D*）相关；扩散率是描述分子运动特性的量。

随着这项新技术在实验和深度学习方面不断取得进展，我们预计 NSM 将对单分子科学领域产生重大影响。

**当前与未来的挑战**

NSM 已展现出卓越的性能，能够可视化并分析在纳米流体通道内溶液中扩散的单个生物分子。然而，要使这项技术在研究和产业界得到广泛应用，仍有许多挑战亟待解决。

最显著的缺点是**通量较低，**这使得异质样品的分析非常耗时。这是因为目前的实验一次只能测量一个纳米通道。原则上，可以对充满显微镜整个视野的数百个纳米通道进行并行分析，但相机在全帧模式下运行时性能较低，因而难以实现。复杂生物流体中的**纳米通道堵塞**在所难免，目前也仅得到部分缓解。具体而言，样品预过滤非常耗时，而且纳米通道壁的钝化还需要更加稳健。在数据分析方面，目前的计算机视觉流程存在一项重大局限：样品浓度较高时，性能**会下降**。最后，已有报告显示，NSM 的性能可分析分子量低至数十千道尔顿的生物分子。然而，低于这一限值的生物物质种类繁多，并且在许多生物分子研究应用中至关重要。因此，提升**检测限**的策略仍有待实施。

除了对单个生物分子进行称重和测量尺寸外，NSM 在其他多个应用领域也具有潜力，未来的挑战可能与这些应用的发展有关。例如，无标记且无需系留地**研究生物分子相互作用**，对于推动许多重要领域的发展（如医学和药物研究）至关重要。为定量分析相互作用动力学，并记录特定物种中具有统计学意义数量的结合事件和解离事件，需要使用能够将生物分子封装在反应体积内的工具。若要了解所研究生物分子的**特异性**，则可采用基于亲和力的单分子检测。这需要将分析物特异性受体固定在纳米通道壁上。

NSM 的基本原理同样适用于光谱可见光范围之外，只要现有红外探测器和光源的性能足够。**单分子显微术与光谱学的结合**在纳米物质分析方面前景广阔，能够提供丰富的化学组成和结构组成信息。

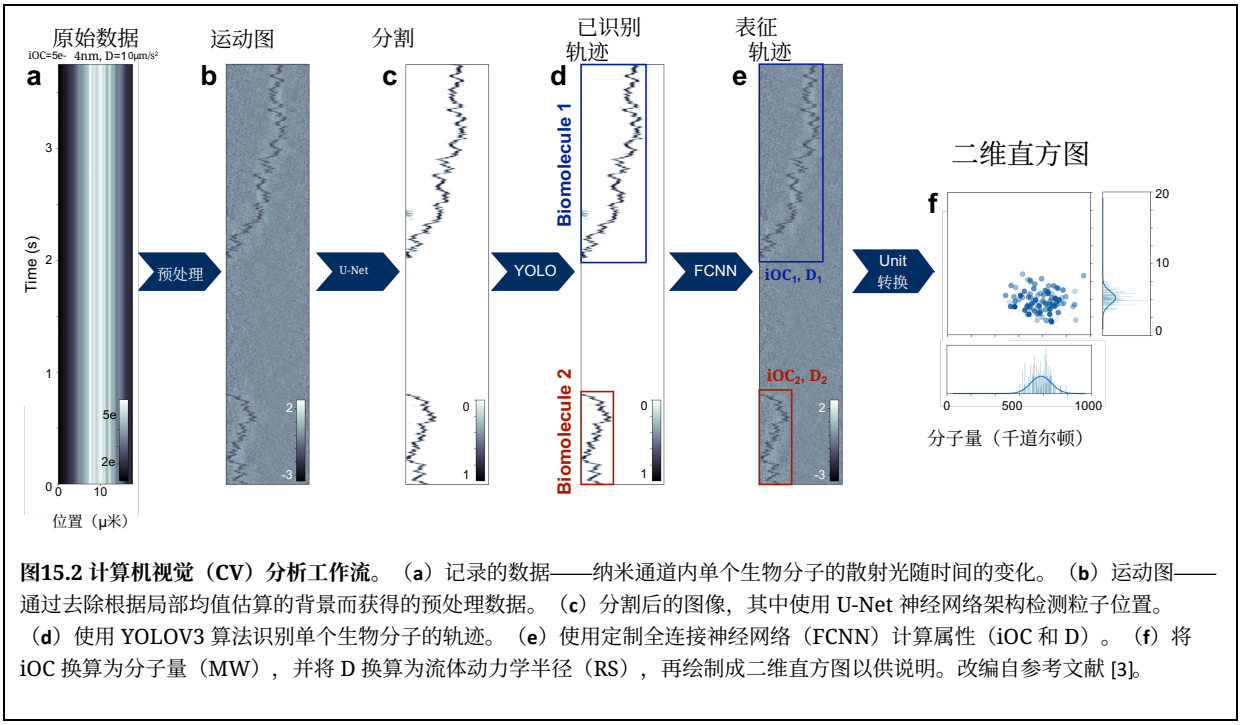


**图15.2 计算机视觉（CV）分析工作流。**（**a**）记录的数据——纳米通道内单个生物分子的散射光随时间的变化。（**b**）运动图——通过去除根据局部均值估算的背景而获得的预处理数据。（**c**）分割后的图像，其中使用 U-Net 神经网络架构检测粒子位置。（**d**）使用 YOLOV3 算法识别单个生物分子的轨迹。（**e**）使用定制全连接神经网络（FCNN）计算属性（iOC 和 D）。（**f**）将 iOC 换算为分子量（MW），并将 D 换算为流体动力学半径（RS），再绘制成二维直方图以供说明。改编自参考文献 [3]。

**应对挑战的科学技术进展**

NSM 的进一步发展需要科学与技术多个领域的共同努力，并将取决于现代机器学习分析工具、微纳流体技术、纳米制造和光学探测器的进步。

在人工智能进展方面，近期几何深度学习在粒子追踪和表征方面取得的进展，为高保真度、高样品浓度研究提供了前景可观的补充方法 [4, 5]，；当前的计算机视觉流程在这类研究中面临的困难最大。由于 NSM 人工智能模型完全使用模拟数据训练，其性能受可用计算能力的限制。因此，随着新一代图形处理器和张量处理器以惊人速度问世，NSM 分析的性能也将随之提升。最新的理论分析预测，利用现有的更高计算能力并进一步优化模型，可使检测限提高一个数量级。因此，可以预期，很快便能对个位数千道尔顿范围内的生物分子进行分析。

随着**探测器技术**的进步，市面上的CMOS相机帧率迅速提升，灵敏度有所提高，动态范围也更大。因此，NSM方法将通过并行分析多个通道来提高通量，并实现对更小分子的更精确测量。

**纳米与微流控技术**是一个快速发展的领域，不断为 NSM 方法的进一步发展与应用带来新的可能性。例如，微流控分选系统 [6] 可在芯片上进行过滤，从而有效解决堵塞问题。新的工具（如纳流控阀 [7] 和捕获器 [8]）为高效限制和释放超低体积的液体提供了手段。这种能力对于开发未来的应用至关重要，例如在单分子水平进行分选，或研究纳流控反应器内的生物分子相互作用。

可用于**纳米制造**的新材料有望为提高该方法的灵敏度带来新的可能性 [9]。此外，大规模纳米制造方面的进展将为 NSM 成为一种可靠且经济高效的生物分析方法铺平道路。

## 总结

目前，NSM 已能够在多种生物流体中，对单个生物分子和生物纳米颗粒进行高精度的无标记、无系留表征。仪器设备和深度学习工具的预期进步将进一步提升其性能。尤其是，在个位数千道尔顿范围内实现高通量和高分辨率，将为需要分析高度异质样品的众多生物分析应用提供支持，例如外泌体表征或直接检测小分子结合 [10]。对溶液中扩散的单个生物分子进行长期监测，为研究构象变化、聚集过程以及单个生物分子之间的相互作用提供了尚待探索的机会。此外，由于纳米流体平台最大限度地减少了样品稀释，NSM 在运输超低体积样品方面效率极高，例如单个细胞的细胞内物质或分泌代谢物，从而为实时无标记单细胞研究铺平道路。此外，NSM 有望在生物分析领域之外找到应用，例如无机纳米颗粒表征、颗粒计数或单颗粒分析。


## 致谢

作者感谢瑞典战略研究基金会项目 *FFL15-0087 (C.L.)* 和捷克科学基金会项目 *22-18203S (B.S.)* 提供的资金支持。本研究的部分工作在查尔姆斯纳米制造实验室 *MC2* 完成，并在查尔姆斯卓越计划 *Nano* 的框架下开展。


## 参考文献


1. H. Miller 等，“生物物理学中的单分子技术：方法与应用进展综述”，*Rep Prog Phys* **81**(2)，024601，2018年。2. R. W. Taylor 和 V. Sandoghdar，“干涉散射显微术：通过瑞利散射观察单个纳米粒子和分子”，*Nano Lett.* **19**(8)，4827—4835，2019年。3. B. Špačková 等，“无标记纳流体散射显微术：测量单个扩散分子和纳米粒子的尺寸与质量”，《自然·方法》，2022年。4. M. M. Bronstein 等，“几何深度学习：超越欧几里得数据”，*IEEE SignalProcessing Magazine* **34**(4)，18—42，2017年。5. J. Pineda 等，“几何深度学习揭示微观运动的时空指纹”，*Nat. Mach. Intell.*，2023年。6. M. Bayareh，“被动式微流控器件中颗粒分离的最新综述”，*Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **153**，107984，2020年。7. Y. Xu、M. Shinomiya 和 A. Harada，“在飞升级纳米流体通道中局部自组装的软物质调控主动纳米阀”，*Advanced Materials* **28**(11)，2209—2216，2016年。8. M. Krishnan、N. Mojarad、P. Kukura 和 V. Sandoghdar，“流体中纳米级对象的几何诱导静电捕获”，*Nature* **467**(7316)，692—695，2010年。9. Y. Xu，“纳米流体学：材料科学的新领域”，*Advanced Materials* **30**(3)，1702419，2018年。10. G. Young 等，“单个生物大分子的定量质量成像”，《科学》**360**(6387)，423—427，2018年。

# 16 — 粒子追踪

Saga Helgadottir[1,2]

1. SciLifeLab 生物图像信息学组，乌普萨拉大学信息技术系 2. 瑞典斯德哥尔摩大学生物化学与生物物理系

## 状态

追踪单个粒子的运动，已成为探索微观世界的重要工具。一个多世纪前，人们还需要手动确定粒子的位置；如今，粒子追踪已从那时发展到采用标准算法，乃至在显微镜成像中使用深度学习。粒子追踪的早期典范之一，是让·佩兰于 1910 年证明原子在物理上的存在。佩兰将溶液中微小胶体颗粒的图像投影到一张纸上，并手动追踪它们的位置；尽管时间分辨率仅为 30 秒，他仍成功量化了它们的布朗运动 [1]。

现代粒子追踪主要采用一种通常称为“数字视频显微术”的技术，这项技术于 20 多年前问世 [2]，：通过拍摄微观粒子的视频，再使用计算机算法确定每帧中粒子的位置。直到几年前，标准算法通常基于对黑白阈值化图像中粒子质心的测量，或基于粒子的径向对称中心 [3]，；当其理想实验条件假设得到满足时，通常要求粒子具有球对称性，且成像时照明均匀、恒定，这些算法便能成功实现亚像素分辨率。在不够理想的实验条件下，其性能会大幅下降，而且需要用户进行大量干预；这不仅耗时，还可能引入用户偏差。

近几年，一种基于人工神经网络的机器学习方法——深度学习——已开始应用于数字视频显微术。与标准算法不同，深度学习算法能够自主学习如何利用一系列输入数据及其对应的期望输出，来确定执行特定任务的规则；在粒子追踪中，这些数据就是粒子的图像及其在图像中的坐标。深度学习在粒子追踪方面的早期成果已表明，在具有挑战性的实验条件下，深度学习在准确定位粒子方面优于标准算法；在许多情况下，它还能通过模拟训练数据来消除用户偏差 [4] **(图 16.1a-d)**。然而，仍有很大的改进空间，深度学习在粒子追踪方面的潜力尚未得到充分发挥。

## 当前与未来的挑战

一项主要挑战在于训练数据的可用性，无论是数量还是质量方面都是如此 [5]。虽然可以使用实验采集的数据训练深度学习算法，但将其应用于粒子追踪时，这样做会变得越来越困难。每种实验设置都需要采集大量数据，而且要以足够高的精度确定粒子的真实位置也极其困难，因为这些位置往往需要人工标注。这个过程既耗时，也会将算法的准确度限制在人类水平，同时还会引入偏差。使用模拟粒子图像训练算法，在一定程度上解决了这一问题，因为这类图像的真实位置可以精确确定。如果能够对粒子图像进行物理模拟，使其复现每位用户的实验装置——从粒子的性质到用于采集数据的仪器的光学性质——就尤其有用。然而，模拟训练数据往往并不可行；对于大多数成像模态中采集的非对称对象和生物物体而言，情况确实如此

当无法通过数值方式准确复现实验装置时，可以通过数据增强来扩充原始实验数据集 [6]。甚至已经开发出一种特殊的深度学习算法，能够生成额外的合成训练图像，作为数据增强的一种形式。增强有助于训练过程，但无法取代高质量的训练数据。

第二个主要挑战与标准算法面临的挑战相同：训练好的算法通常针对特定问题进行了调整，难以泛化，因此往往无法用于分析包含不同粒子类型的数据，或使用其他实验装置获取的数据。再加上开发定制深度学习解决方案的学习曲线陡峭，深度学习在粒子追踪和数字视频显微术领域的应用整体上仍不充分。现已有预训练算法可供使用，实际上也很容易将其应用于新数据 [7]。然而，只有在没有更好的、针对当前问题定制的替代方案时，这些算法的结果才往往可以接受。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习应用于粒子追踪，最显而易见的发展方向是让高质量训练数据更易获取，以便针对每组实验定制训练算法，甚至训练出通用的粒子追踪算法。在这种情况下，持续开发能够准确地合成再现更复杂实验装置的方法至关重要，这些装置用于通过各种成像模态对非对称粒子进行成像。该领域的协作文化为快速发展创造了理想环境，开源软件包不断涌现，使其他研究人员能够根据各自的专业知识贡献额外功能 [6]。这些软件包也致力于提升易用性，让用户无需具备特殊编程技能便能开发定制的深度学习解决方案，从而使更广泛的群体都能使用。

另一种有趣的方法是开发巧妙而简单的深度学习算法，无需大量带有已知真实标签的数据。人们正在提出新颖的深度学习方法，仅使用一张无标签粒子图像进行训练，即可针对任意粒子形态达到亚像素精度 [8] **(图 16.1e-f)**。这类解决方案无需模拟粒子图像来获得准确且无偏差的真实位置，并且有望适用于大多数粒子类型和成像模态，尤其适用于均质样品。得益于其简便性，它还可以针对每组问题轻松定制解决方案，几乎不需要用户具备专业知识，并且可在普通计算机上于几分钟内完成训练。

迄今为止，深度学习方法沿用了传统的粒子追踪方式，只提供了一种数据驱动的标准算法变体，侧重于寻找图像中单个粒子的坐标。为了进行进一步分析，随后会采用其他标准方法将这些坐标连接成单粒子轨迹。新的方法能够更充分地利用深度学习的潜力，分析粒子的动力学，直接生成相互连接的粒子坐标轨迹，同时推断样品的局部和整体动力学性质 [9]。这有望改进对这类样品的分析：实验过程中粒子可能消失、新粒子可能出现，或粒子形状可能发生变化；这在生物样本中尤为常见。使用人工标注的实验数据进行训练时，算法甚至能够学会纠正训练数据集中的不完美标注。

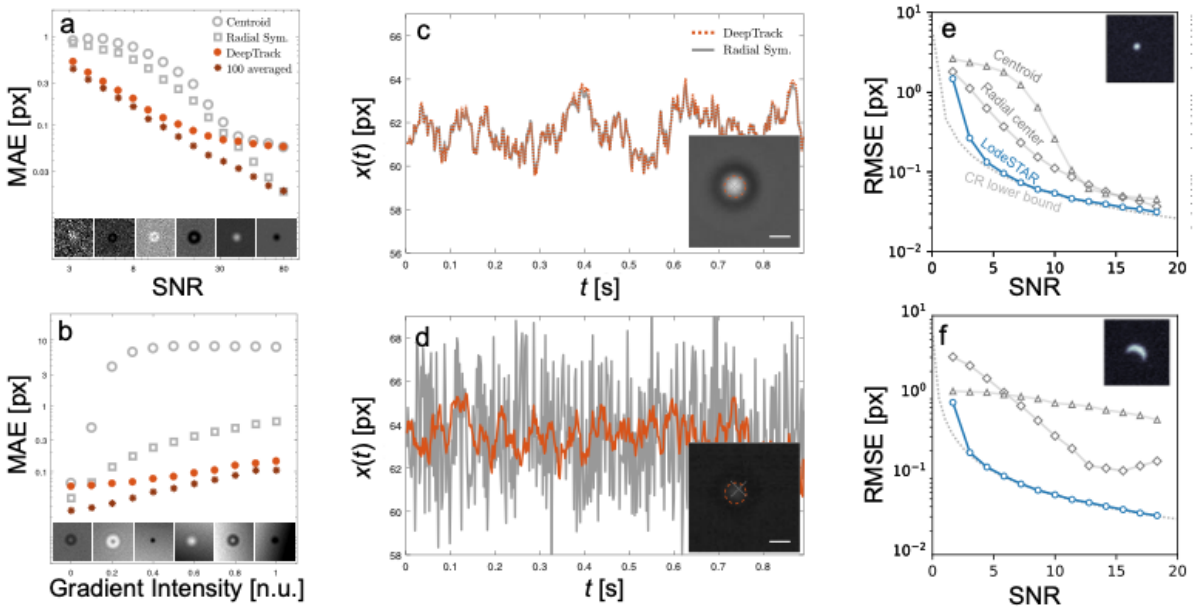


**图16.1 使用神经网络进行粒子追踪。(a-d)** 在模拟粒子图像上训练的深度学习算法（橙色），在高噪声条件下准确检测对称粒子的模拟图像中的粒子位置方面，表现优于标准算法（灰色）；这些模拟图像受到不同信噪比（**a**）和照明梯度（**b**）的影响。对光阱捕获粒子的实验追踪也呈现出同样的结果（**c,d**）。在最佳照明条件下，深度学习算法与标准算法得出相同结果（**c**），但在具有挑战性的条件下，标准算法的追踪结果会变得不稳定（**d**）。改编自 **a-d** 在模拟粒子图像上训练的深度学习算法（橙色），在高噪声条件下准确检测对称粒子的模拟图像中的粒子位置方面，表现优于标准算法（灰色）；这些模拟图像受到不同信噪比（**a**）和照明梯度（**b**）的影响。对光阱捕获粒子的实验追踪也呈现出同样的结果（**c-d**）。在最佳照明条件下，深度学习算法与标准算法得出相同结果（**c**），但在具有挑战性的条件下，标准算法的追踪结果会变得不稳定（**d**）。**e-f**新型深度学习算法可使用单张未标注实验图像进行训练，在不同信噪比影响下，对称（**e**）和非对称（**f**）粒子的追踪表现均优于标准算法。经许可改编并转载自[4] 和[8]。M 参考文献[4]。**(e-f)** 新型深度学习算法可使用单张未标注实验图像进行训练，在不同信噪比影响下，对称（**e**）和非对称（**f**）粒子的追踪表现均优于标准算法。改编自参考文献[8]。

## 总结

尽管近年来取得了成功，深度学习在粒子追踪方面仍有巨大的潜力。对粒子图像进行更精确的物理模拟，将有助于更准确地追踪单个粒子，同时避免耗时且容易引入偏差的人工真实值标注。随着推理速度不断提升，训练好的算法也可以部署在实验装置中，用于实时粒子跟踪和决策。更进一步来说，新的快速、易于训练的算法只需一张未标注训练图像，甚至让实验过程中现场训练和追踪粒子成为可能。

追踪粒子通常只是进一步分析系统动力学所必需的第一步。深度学习不仅可用于获取粒子坐标，还能同时计算其他粒子特征，并直接返回单粒子轨迹以及整个系统的潜在动力学。


## 致谢

本项目的研究工作获得了 *H2020* 欧洲研究委员会（*ERC*）启动基金 *ComplexSwimmers*（*677511*）以及 *SciLifeLab* 生物图像信息学组的资助。


## 参考文献


1. J. Perrin，“布朗运动与分子”，*J. Phys. Theor. Appl.* **9**，5—39（1910）。2. J. C. Crocker 和 D. G. Grier，“胶体研究的数字视频显微方法”，*J.Colloid Interface Sci.* **179**，298—310（1996）。

3. R. Parthasarathy，“通过计算径向对称中心实现快速、准确的粒子追踪”，《自然·方法》**9**，724—726（2012年）。4. S. Helgadottir、A. Argun 和 G. Volpe，“深度学习增强的数字视频显微术”，*Optica* **6**，506—513（2019年）。5. B. Midtvedt、S. Helgadottir、A. Argun、J. Pineda、D. Midtvedt 和 G. Volpe，“基于深度学习的定量数字显微术”，《应用物理评论》**8**，011310（2021年）。6. C. Shorten、T. M. Khoshgoftaar，“深度学习图像数据增强综述”，《大数据》**6**，1—48（2019年）。7. D. Ershov 等，“将 TrackMate 带入机器学习和深度学习时代”，bioRxiv（2021年）。8. B. Midtvedt 等，“单次自监督粒子追踪”，arXiv 预印本 arXiv:2202.13546（2022年）。9. J. Pineda 等，“几何深度学习揭示微观运动的时空指纹”，arXiv 预印本 arXiv:2202.06355（2022年）。

# 17 — 单次拍摄自监督目标检测

Benjamin Midtvedt[1], Giovanni Volpe[1]

1. 哥德堡大学物理系，瑞典哥德堡

## 状态

深度学习是显微镜成像领域中快速发展的一个方向，旨在改进图像分析，并自动化从图像中识别和提取信息的过程，从而实现更高效、更准确的数据分析。目标检测是深度学习优于传统方法的一项任务。然而，大多数用于显微镜成像目标检测的深度学习方法，都需要大量人工标注数据集，或对实验进行高度逼真的物理模拟 [1]。对于许多应用而言，这是一道难以承担的高成本门槛。最近，我们推出了 LodeSTAR，这是一种自监督低样本深度学习方法，通过利用目标检测任务固有的旋转平移对称性来应对这一挑战 [2]。

与其他深度学习方法相比，LodeSTAR 的主要优势在于只需极少的训练数据便能取得出色的性能。与需要大量人工标注数据集或高度逼真的物理模拟的传统方法不同，LodeSTAR 只需一张或少量未标注实验图像即可完成训练。事实上，研究表明，LodeSTAR 使用的训练数据量少 1000 倍，便能在细胞跟踪挑战赛中达到最先进细胞检测方法的性能（**图 1a-b**）[3] 。因此，对于从事缺乏标注数据集的领域研究，或标注过程耗时且成本高昂的研究人员而言，它是理想的解决方案。

LodeSTAR 的另一项显著特点是能够高精度地找到对象的亚像素位置。事实上，仅使用一张图像进行训练，LodeSTAR 在各种对象上的精确度都达到了理论上的克拉美–罗下界。这对于精确目标定位至关重要的应用尤为有用，例如粒子追踪、单分子定位或超分辨率显微镜技术。传统方法难以达到这种精确度，而这一能力为从事需要亚像素精确度领域研究的人员开辟了新的可能性。

除了检测之外，如果存在可利用的对应关系，LodeSTAR 也能执行某些回归任务。在许多干涉测量模式中，例如全息显微镜，可以在事后通过数值方式改变焦平面。这就建立了对象的 z 轴位置与数值再传播变换之间的对应关系。同样，在许多定量测量模式中，信号强度与对象的某种物理属性成正比。LodeSTAR 利用这些关系，在三维空间中定位亚波长聚苯乙烯微珠（**图1c**），并测量细胞内聚集体的光学质量（**图1d**）。

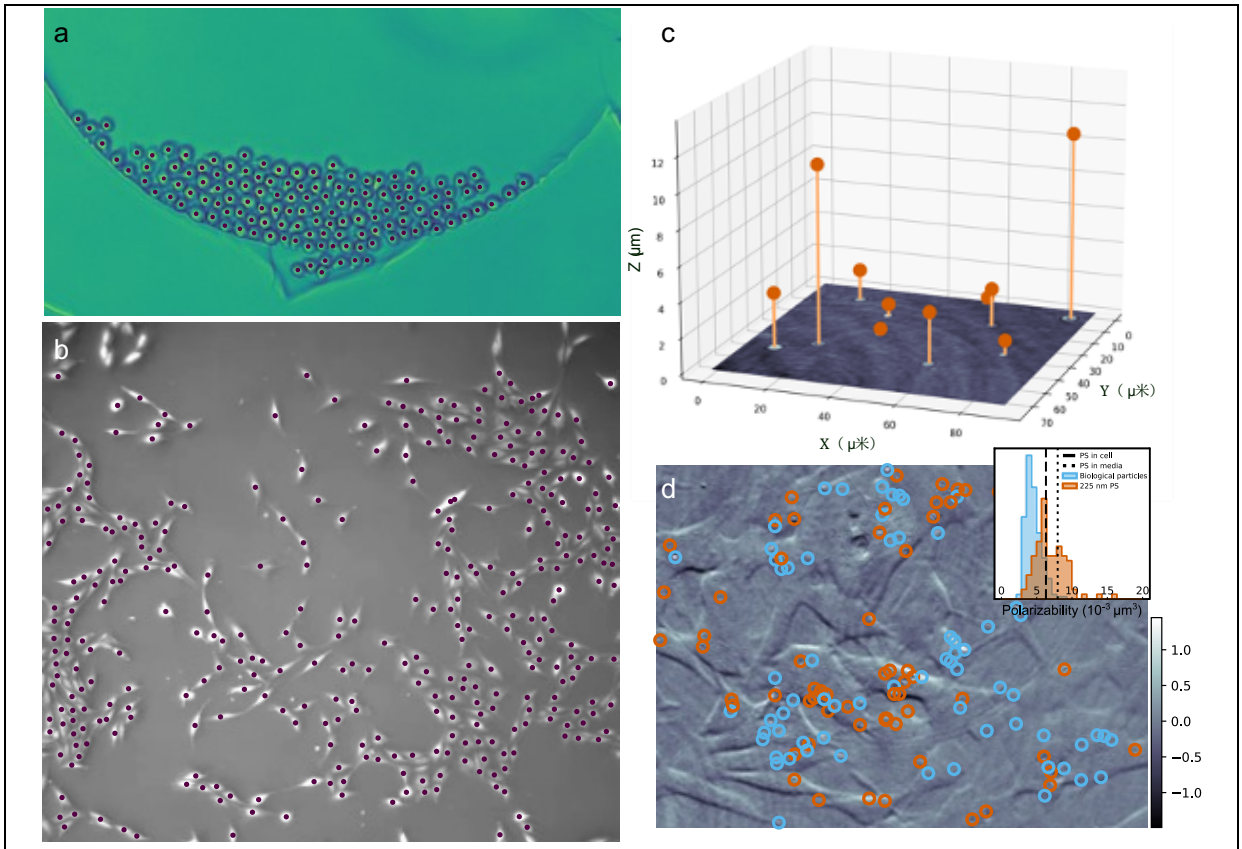


**图17.1 使用 LodeSTAR 实现高质量检测。** LodeSTAR 仅使用单个对象实例的一张图像进行训练，便能在一系列实验配置中实现最先进的检测性能。**(a)** LodeSTAR 可检测密集排列的小鼠干细胞的明场图像。**(b)** LodeSTAR 可检测胰腺干细胞的相差图像。**(c)** LodeSTAR 可根据离轴全息图像，在三维空间中检测并定位亚波长聚苯乙烯微球。**(d)** LodeSTAR 可检测细胞内物体并测量其极化率（橙色为直径 225 nm 的聚苯乙烯微球，蓝色为生物聚集体）。改编自参考文献 [2]。

**当前与未来的挑战**

尽管 LodeSTAR 仅需少量训练数据便能实现出色的性能，但需要注意的是，它目前只能提供对象的位置，而无法提供其尺寸或形态信息。对于某些需要获取检测对象更详细信息的应用，这可能构成限制。不过，在细胞计数和粒子追踪等应用中，这并不会造成限制。

LodeSTAR 的另一项局限是无法有效利用大量数据来提高特异性。尽管它在低样本量情形下优于其他方法，但在数据充足时可能会落后。这是自监督学习普遍存在的问题：由于缺乏监督，其学习过程往往缺少明确引导。

LodeSTAR 的另一个局限是，它针对小型到中型对象进行了优化，通常适用于尺寸不超过 60–100 像素的对象。虽然它已被证明能够有效检测这一尺寸范围内的对象，但在较大的对象上可能表现不佳。这是因为该方法依赖于利用目标检测任务固有的旋转平移对称性，而这种对称性在较大的对象中可能不那么普遍。对于单分子定位等某些应用而言，这一局限性可能不那么重要，因为感兴趣对象相对较小。不过，对于组织成像中检测大型细胞或结构等其他应用，这可能会成为一种限制。在这些情况下，可以通过以较低分辨率对图像进行采样来解决这一问题。这样做可以提升检测效果，但代价是降低位置精度。然而，对于大型结构而言，单一位置这一概念的定义不够明确，而且通常与应用的关联也较小。

**应对挑战的科学技术进展**

未来研究的一个重要方向，是扩展 LodeSTAR 在学习过程中所利用的变换和对称性集合。目标是训练 LodeSTAR 提取形态信息。例如，通过引入尺度变换，可以使 LodeSTAR 学会预测对象的相对尺寸。然而，仅凭这一点不足以确定绝对尺寸，还需要额外的变换。

另一种方法是采用更易于解释的网络架构，例如视觉Transformer [4]。研究表明，在解决一致性任务时，这些架构能够自然地产生对象分割。不过，需要注意的是，用视觉Transformer替换当前的卷积主干网络可能会导致平移等变性丧失，从而对 LodeSTAR 的位置定位性能产生负面影响。

目前，LodeSTAR 仅使用正样本进行训练，即包含待检测对象的图像。一个潜在的研究方向是扩展训练过程，将负样本也纳入其中，即不包含任何该对象实例的图像。这有助于在包含多个视觉上相似类别的样品中提高特异性，因为这类样品中只有部分类别是我们关注的。

最后，目前 LodeSTAR 的设计要求每个视图中的图像恰好包含一个对象实例。不过，可以对其进行扩展，使其能够在训练期间处理每个视图中包含多个对象实例的情况，从而利用更大的数据集进行学习；在这类数据集中，视野中的对象数量可能会随时间变化。然而，这也会降低训练的特异性，因为视野中的所有对象都会被检测出来，无论它们是否是关注对象。寻找减轻这一问题的方法将是一个重要的研究方向。

**总结**

LodeSTAR 是一种用于显微镜成像中目标检测的深度学习方法，尤其适用于低数据情境。LodeSTAR 利用目标检测固有的旋转平移对称性，只需极少的训练数据即可实现高性能。其独特的自监督训练过程使其能够从单张或少量未标注实验图像中学习，为在缺少标注数据集的领域开展研究的人员提供了一种经济高效的解决方案。此外，LodeSTAR 能够高精度地确定对象的亚像素位置，这是它区别于传统方法的一项关键特性。在需要精确定位对象的应用中，例如粒子追踪、单分子定位或超分辨率显微镜技术，这种精确度尤为有用。再加上 LodeSTAR 能够利用额外的关系和对称性来测量其他物理量，使其成为显微镜成像领域一种用途广泛且功能强大的方法。

**致谢**

作者谨此感谢 *H2020* 欧洲研究委员会起始基金 *ComplexSwimmers*（基金编号：*677511*）、欧洲地平线计划 *ERC* 整合者资助 *MAPEI*（基金编号：*101001267*）以及克努特与爱丽丝·瓦伦堡基金会（基金编号：*2019.0079*）的资助。

**参考文献**

1. B. Midtvedt、S. Helgadottir、A. Argun、J. Pineda、D. Midtvedt 和 G. Volpe，《运用深度学习进行定量数字显微术》，《应用物理评论》 **8**(1), 011310, 2021年。2. B. Midtvedt 等，《显微镜成像中的单次拍摄自监督目标检测》，《自然·通讯》 **13**(1), 7492, 2022年。

3. V. Ulman 等，《细胞追踪算法的客观比较》，《自然·方法》 **14**(12), 1141—1152, 2017年。4. A. Dosovitskiy 等，《一张图像胜过 16×16 个词：用于大规模图像识别的Transformer》，CoRR, 2010.11929, 2020年。

# 19 — 扩散表征

Stefano Bo[1,2], Lars Hubatsch[3]

1. 马克斯·普朗克复杂系统物理研究所，Nöthnitzer Straße 38，DE-01187 德累斯顿，德国 2. 伦敦国王学院物理系，伦敦 WC2R 2LS，英国 3. 马克斯·普朗克分子细胞生物学与遗传学研究所，Pfotenhauerstraße 108，01307 德累斯顿，德国

## 状态

活细胞成像彻底改变了我们对生物过程的理解。过去几十年来，分辨率和信噪比稳步提升。因此，我们能够记录单个粒子的轨迹，在避免整体标记带来的一些伪影的同时，详细描述微观动力学。单粒子追踪（SPT）揭示了周围环境以及那些会被系综平均掩盖的过程的特征，从而开启了一扇观察之窗，让我们得以更深入地理解许多生物过程。

为了探测异质环境中的分子性质，并实现对生物过程的定量建模，判断粒子是经历正常扩散还是反常扩散（根据均方位移的幂律标度定义：MSD ~$t^{\alpha}$），并测量其扩散系数或反常标度指数α，十分重要。这些尺度上的运动本质上具有随机性，可能涉及在时间和空间上都存在显著变异性的过程。因此，基于粒子轨迹研究扩散颇具挑战。

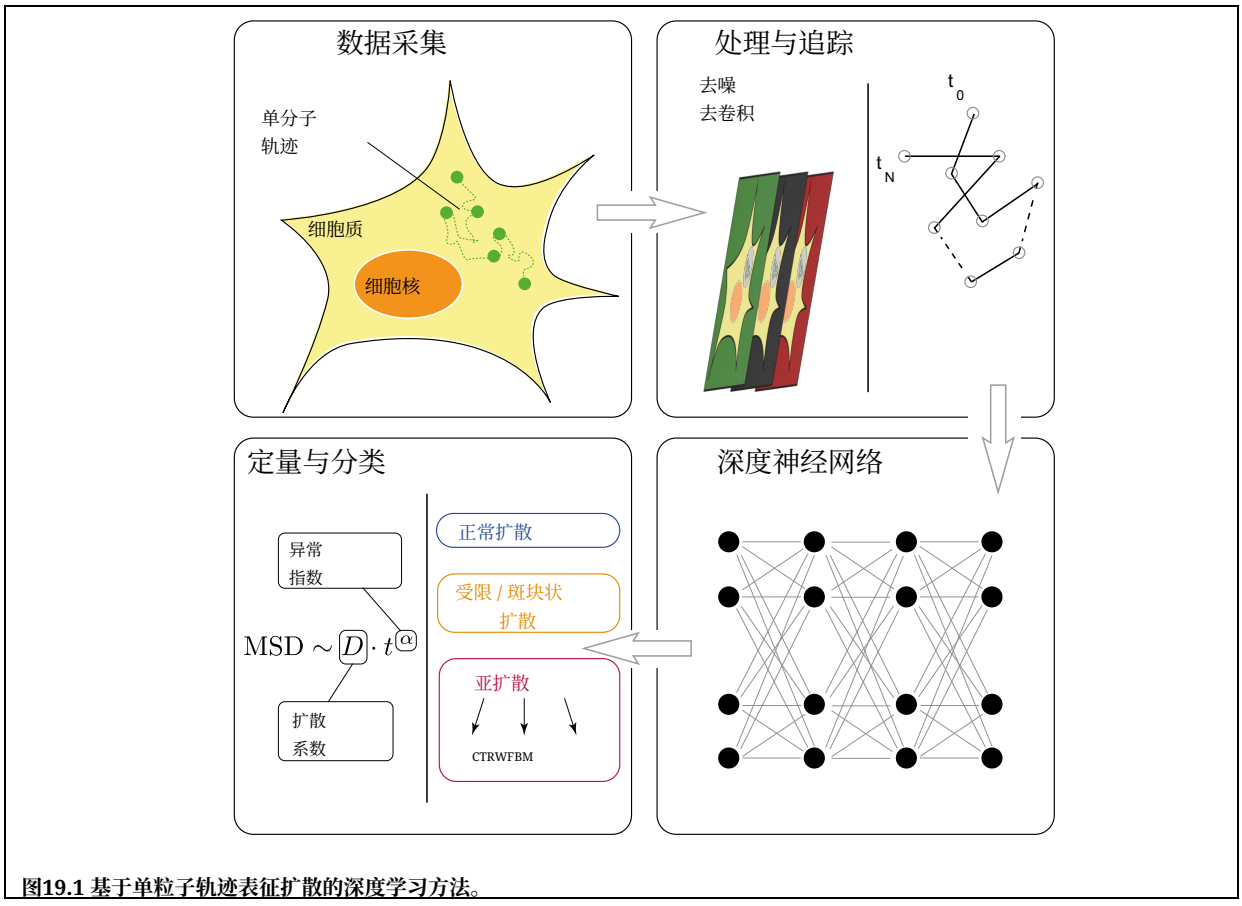


**图19.1 基于单粒子轨迹表征扩散的深度学习方法。**

首要挑战在于识别粒子、对其进行定位并重构其轨迹。过去十年间，人们已为此开发出各种方法[1]，，而深度学习技术也日益受到广泛关注[2]。

第二个主要挑战是从重构的轨迹中提取信息。扩散是一种与粒子涨落有关的现象，换言之，信号存在于噪声之中，因此这一任务颇具难度。即使是简单扩散，直接应用爱因斯坦在1905年提出的结果 MSD ~ Dt，也可能造成严重偏差，例如偏差可能取决于定位精度、轨迹长度、可用轨迹的数量，或周围介质运动引起的涨落。为解决这些问题，人们开发了可校正实验噪声的方法，以及适用于不同应用场景的最优拟合算法[3]。反常扩散动力学甚至更难分析，例如可用连续时间随机游走 (CTRW)、分数布朗运动 (FBM)和列维行走 (LW)进行建模；这是由于动力学中存在长期相关性，并且可能发生遍历性破缺[4]。分析这类动力学的大多数方法都依赖渐近行为，因此需要大量较长的轨迹，而这类轨迹在实验中通常难以获取。这推动了深度学习技术的发展，用于测量扩散系数和反常指数，并识别反常行为背后的模型[4-7]。这些技术通常采用人工卷积神经网络(CNN)或称为长短期记忆网络(LSTM)的循环神经网络。它们显著提升了对较短单条轨迹的分析能力，也适用于单条轨迹在不同扩散动力学之间切换的情况。

**当前与未来的挑战**

深度学习技术的一个优势在于具有泛化能力， 也就是说，能够正确分析与训练数据不同的情形。对于单粒子轨迹的应用，这意味着通过模拟廉价生成的合成数据训练的算法可以用于实验。参考文献 [4-7] 中开发的技术采用监督方法，在模拟数据上训练网络；也就是说， 用于模拟输入数据的参数（例如扩散系数、反常指数或模型类型）是已知的，并用于为输入数据标注。随后，要求网络给出尽可能接近标签的预测。这些方法已证明具有广泛的适用性：它们能够正确预测训练期间未见过的实验轨迹，也能够处理测量噪声。然而，这些成功案例通常并不能保证在模拟数据上训练的网络可以直接用于实验。要评估泛化问题，还需要进一步研究，了解网络作出决策的依据。这有助于让预测更具可解释性和透明度。可解释性可以显著拓展深度学习模型在扩散研究中的科学应用，将网络行为与底层物理原理和结构关联起来。正如建立物理理论能够加深对物理现象的机制性理解，并超越测量与推理一样，提高深度学习的可解释性也有助于加深物理理解。此外，了解深度学习方法如何根据粒子轨迹估算扩散，或可推动开发受深度学习方法所得解启发的新算法和统计技术。事实上，可解释性方面的进展或许能为向机器学习开辟道路。然而，由于维数很高且参数众多，要揭示深度学习模型的内部运作机制向来十分困难。

另一个挑战与监督方法有关。这些方法从其设计本质上来说，只能预测训练过程中教给它们的标签。例如，一种仅用于推断扩散系数的方法，无法检测反常扩散或其标度指数。同样，对于动力学分类，典型的网络只能在其设计所涵盖的类别中给出答案。另一个相关挑战是如何利用深度

学习捕捉反常扩散的瞬态特性，因为在不同尺度上会观察到不同的标度区间。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习领域正在迅速发展，并不断提供可应用于各个子领域的见解。例如，许多用于提高深度学习技术可解释性的工具目前正在开发中（参见例如参考文献 [8]）。这一方向最有前景的成果涉及深度神经网络，例如用于图像分类的卷积神经网络。这些新工具能够识别促成相应分类的图像中最重要的部分或特征。对于单粒子追踪，可以应用这些算法（还应将其扩展至长短期记忆网络），以确定轨迹中哪些部分对其分类影响最大。

与此同时，自编码器和 Transformer 架构也已得到开发 [9]。Transformer 目前是处理自然语言的最佳技术之一，例如可用于翻译。其架构中包含注意力层，作用是识别输入的不同部分彼此之间的关联程度（例如，学习句子中的主语与动词有很强的关联）。

开发用于解读现有深度学习架构的工具，与开发更具可解释性的架构相结合，有望识别出扩散轨迹中最能提供信息、最有助于刻画该轨迹的部分。随后，可以对这些结果进行统计分析，从中提取有关哪些轨迹特征或统计性质最能体现其扩散性质的信息。这有助于了解深度学习方法如何进行预测，从而提升其可解释性。

深度无监督学习的进一步进展，有望提供更具洞察力的方法，用于处理不属于其训练所用任何模型的轨迹（参见 [10]，其中通过异常检测迈出了这方面的第一步）。事实上，这些模型的训练不依赖特定标签，而是着重重构输入轨迹，从而学习其显著特征。无监督方法或许也能有效应对这样一类轨迹带来的挑战：它们在不同尺度上呈现出不同的扩散标度。

迄今为止讨论的进展，主要涉及提升深度学习方法可解释性的一般性改进。扩散研究领域的物理信息方法的发展，可能会带来更多进步。这类方法旨在将有关所研究扩散动力学的物理知识纳入考量，例如考虑关键的物理和统计性质，如某些反常扩散动力学的自相似性。

**总结**

深度学习方法已被证明是研究扩散动力学不可或缺的工具，展现出显著的鲁棒性，并显示出将结果推广到未见数据和实验的良好潜力。它们与传统算法和统计技术相得益彰，能够提供更好的性能。因此，我们可以对较短的单条轨迹进行表征，从而扩大能够定量研究扩散的系统范围，其中包括许多轨迹长度通常较短的生物系统。在现阶段，这种性能提升是以结果的可解释性低于传统算法和统计技术为代价的。然而，深度学习技术近期及持续取得的进展，包括新型架构的开发、对其预测结果的解释方法，以及融入物理学知识的方法，表明更透明的

深度学习技术或许已近在咫尺。这些技术有望可靠地揭示扩散粒子的物理属性及其运动环境。这些进展为构建复杂生物过程的未来定量模型奠定了重要基础。

**致谢**

*SB* 谨此感谢与 *Aykut Argun*、*Giovanni Volpe*、*Ralf Eichhorn*、*Alessia Gentili*、*Giorgio Volpe* 的启发性讨论，也感谢在 *ICFO* 举办的 *2021*年*12*月 *AnDi*研讨会的参与者和组织者。

**参考文献**

1. N. Chenouard 等，“粒子追踪方法的客观比较”，《自然·方法》 **11**(3)，2014年。 2. L. Möckl、 A. R. Roy 和 W. E. Moerner，“ 单分子显微术中的深度学习：基础、注意事项与最新进展 [特邀],”《生物医学光学快报》 **11**(3)，1633–1661，2020年。 3. C. L. Vestergaard、P. C. Blainey 和 H. Flyvbjerg，“从单粒子轨迹中最优估计扩散系数”，《物理评论*E*》 **89**(2)，022726，2014年。 4. G. Muñoz-Gil 等，“反常扩散解码方法的客观比较”，《自然·通讯》 **12**(1)，1，2021年。 5. N. Granik 等，“通过深度学习进行单粒子扩散表征”，《生物物理学杂志》**117**(2)，185–192，2019年。 6. S. Bo、F. Schmidt、R. Eichhorn 和 G. Volpe，“使用循环神经网络测量反常扩散”，《物理评论*E*》 **100**(1)，010102，2019年。 7. V. Jamali 等，“深度学习辅助分析揭示了液相透射电子显微镜中的纳米粒子表面异常扩散”，《美国国家科学院院刊》 **118**(10)，e2017616118，2021年。 8. W. Samek、 G. Montavon、 S. Lapuschkin、 C. J. Anders 和 K.-R. Müller，“ 深度神经网络及其他模型的解释：方法与应用综述”，《*IEEE*会刊》 **109**(3)，247–278，2021年。 9. A. Vaswani 等，“《注意力就是一切》”，载于神经信息处理系统进展 **30**，2017 年。 10. G. Muñoz-Gil、G. G. i Corominas 和 M. Lewenstein，“反常扩散数据的无监督学习：一种异常检测方法”，《物理学、数学与理论杂志》 **54**(50)，504001，2021年。

# 20 — 使用 MAGIK 进行微观运动表征

Jesus Pineda[1], Giovanni Volpe[1], Carlo Manzo[2]

1. 哥德堡大学物理系，瑞典哥德堡 2. 维克大学—加泰罗尼亚中央大学（UVic-UCC）科学、技术与工程学院，西班牙维克

## 状态

对生命系统中动态过程的表征，为我们深入理解健康与疾病状态下的生命过程提供了重要信息，也有助于开发新技术和治疗方法 [1]。过去二十年间，光学显微成像取得了显著进展，使我们能够以前所未有的细致程度，在不同的时空尺度上研究细胞、细胞器和单个分子的运动。然而，分析复杂且拥挤环境中发生的动态过程仍然是一项挑战 [2,3,4]。生物运动的多样性是动态分析复杂度的重要来源。例如，细胞的运动表现出很强的变异性，具体情况取决于细胞类型和环境信号等因素。这种变异性给现有方法带来了分析上的挑战，因为这些方法通常针对特定实验或运动模型而设计。因此，分析实验往往需要手动调整参数，以适应不同的动力学特征，从而限制了这些方法的使用和适用范围。

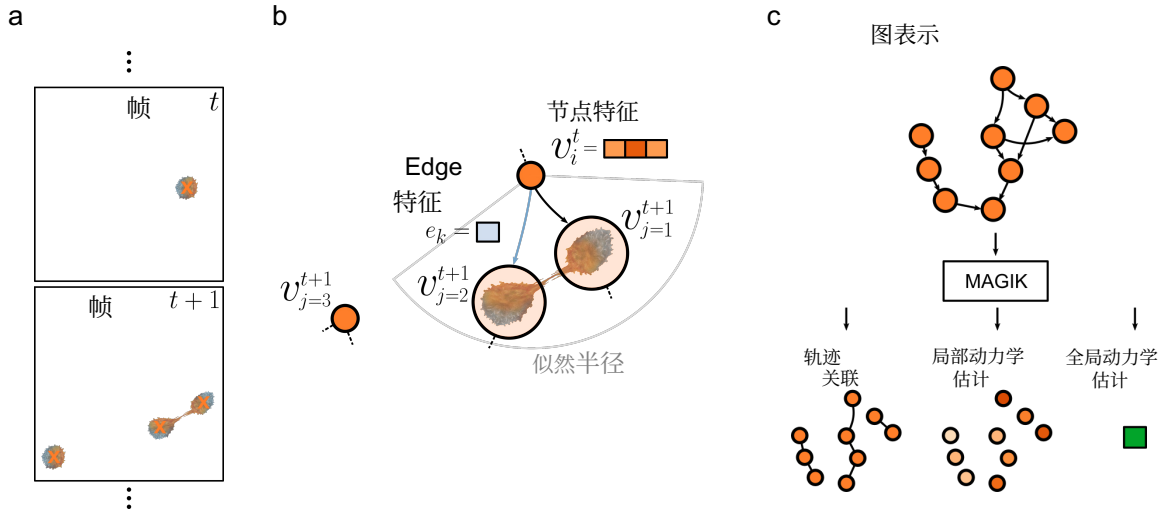


**图20.1 使用 MAGIK 估计时空特征。(a)** 图像序列展示了一组细胞在连续两帧中的演变过程。**(b)** 使用有向图对对象的运动和相互作用进行几何建模。在该图中，节点（$v$）表示检测结果，边则连接时空距离较近的对象。每个节点都包含对象的质心及其他重要描述符，例如形态属性和强度属性。边（$e$）则编码相连对象质心之间的欧氏距离。在此示例中，感兴趣的节点（以下标$i$标记，位于$t$帧中）与$t$+1 帧中基于距离的似然半径范围内的邻近节点相连（以下标$j$标记）。**(c)** 通过自适应注意力图神经网络处理该图，以估计对象之间的关联，并深入了解不同尺度下系统的内在动力学。

最近，我们提出了 MAGIK [5], 一种用于通过延时显微成像分析生物系统动力学的深度学习框架。MAGIK 通过有向图对粒子的运动和相互作用进行建模，其中节点表示检测结果，边连接在时空上彼此接近的节点（**图20.1a-b**）。该框架利用基于注意力机制的图神经网络（GNN）处理图，并通过两种机制调节其元素之间关联的强度。第一种机制是可学习局部感受野 [6]，用于捕捉局部粒子相互作用的复杂度。第二种机制是门控自注意力

这一机制 [7], 使 MAGIK 能够从图中彼此未直接连接、但可提供有关整体动力学的宝贵信息的区域，推断每个粒子的动力学特征。

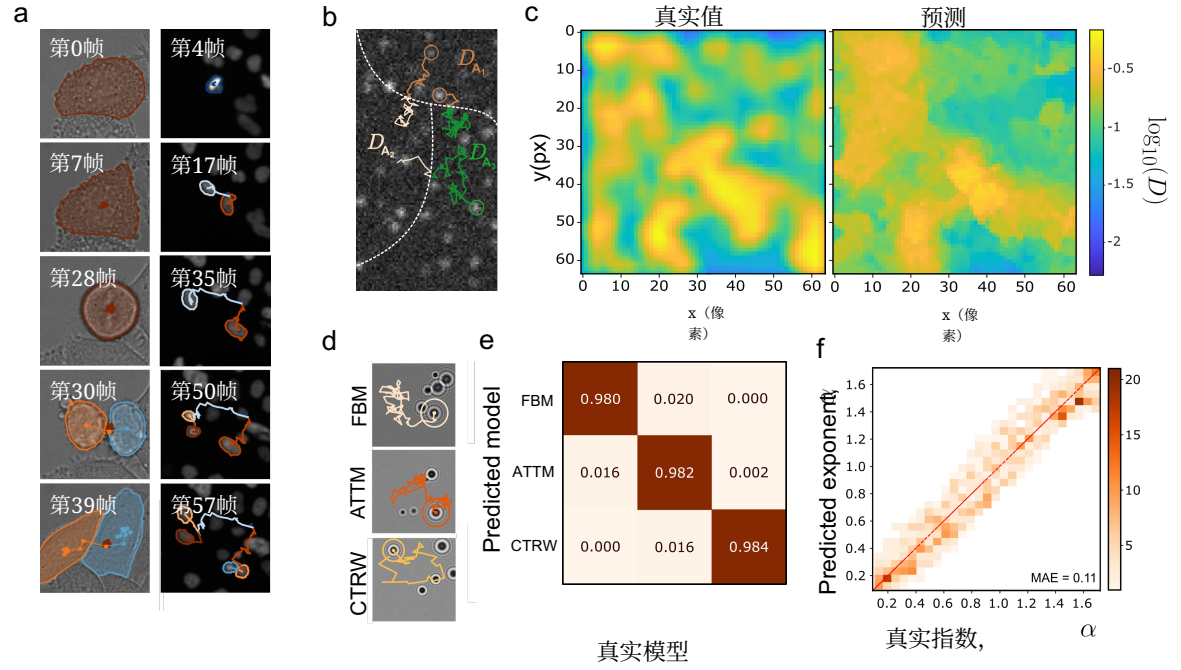


**图20.2 MAGIK 分析了不同尺度下广泛的延时生物实验。(a)** MAGIK 能够有效关联不同实验条件下的轨迹。尽管 HeLa 细胞形状不断变化且反复分裂，MAGIK 仍能以 99.2% 的准确率追踪 DIC-C2DH-HELA数据集中的 HeLa 细胞运动。同样，尽管 Fluo-N2DL-HeLa数据集中的样品密集，且有丝分裂和碰撞频繁，MAGIK 追踪其中 HeLa 细胞的准确率仍达 98.4%。**(b-c)** MAGIK 估计空间调制扩散景观。**(b)** 单目标跟踪实验的荧光显微镜模拟，其中分子进行布朗运动，扩散率 *D* 随空间随机变化。**(c)** 真实空间扩散率模式，以及 MAGIK 使用一段 100 帧长的视频得出的预测。**(d-e)** MAGIK 揭示全局动力学。**(d)** 模拟的全息视频，其中对象分别进行分数布朗运动（FBM）、退火瞬态时间运动（ATTM）和连续时间随机游走（CTRW）。**(e)** 混淆矩阵显示了在 1.496 个验证场景中，对底层扩散模型进行网络分类的性能。**(f)** MAGIK 预测在 1.097 个全息视频中进行 FBM 的对象集成运动所遵循的反常扩散指数。

MAGIK 是一种功能多样的工具，能够执行从将坐标关联成轨迹到确定局部和全局动力学等各种任务（**图20.1c**）。如 **图20.2a**所示，尽管细胞形态和动力学存在异质性所带来的挑战，MAGIK 在 HeLa细胞追踪方面仍展现出可靠的性能。MAGIK 能够准确识别细胞分裂，并估计边缘区域中细胞的轨迹；在这些区域，细胞仅被部分观测到，并会移出视野。此外，MAGIK 在第六届细胞跟踪挑战赛的多个数据集上也取得了出色结果，涵盖多种显微技术和细胞类型 [5]。

MAGIK 的一个独特特点是无需进行检测关联，即可表征动力学方面的特征。借此，MAGIK 能够从高密度实验中获取信息，例如，仅凭粒子定位即可解析空间调制扩散景观（**图20.2b-c**）。值得注意的是，仅凭一段长达 100 帧的视频，就能准确估计大多数空间特征。通过跳过关联步骤，MAGIK 从根本上减少了关联错误向相关参数定量分析的传播，因此能够揭示全局动力学，如以下两个相关示例所示：扩散粒子运动模式的分类（**图20.2d-e**），以及对 [4] 布朗粒子系综中的反常扩散进行定量分析（**图20.2f**）。

**当前与未来的挑战**

深度学习的迅速发展推动了多种用于表征生物系统中运动的技术的开发[2-4]。然而，若干技术和解释方面的挑战阻碍了这些算法的广泛应用。

高质量标注显微镜数据集的匮乏，阻碍了深度学习模型的有效训练和验证。现有数据集往往规模较小且缺乏代表性，因此难以构建规模庞大且可靠的模型。此外，显微镜数据的多样性以及有限的获取渠道，也给数据的利用和整合带来了更多挑战。

深度学习模型通常会在抽象的高维空间中学习输入数据的复杂表征，因此即使是专家，也难以解释这些抽象表征。缺乏可解释性是深度学习在医学和生物学领域广泛应用的一大障碍，尤其是在研究以外的场景中，可解释性至关重要 [8]。此外，针对同一任务出现多种方法，却缺乏对其性能的明确评估，这可能会令非专家感到困惑，并限制这些方法的应用。

深度学习图模型的可扩展性是一项重大的技术挑战。处理包含大量相互作用的大型图表征需要大量计算，并且需要充足的内存和计算资源。因此，直接使用图神经网络（GNNs）分析密集且持续时间较长的动态实验颇具挑战。

**应对挑战的科学技术进展**

MAGIK 框架不断改进，以应对当前深度学习方法在生物系统运动表征方面的局限。MAGIK 的开发重点是打造一个兼具通用性且易于收敛的框架。通过使用能够从有限数据中最大限度提取信息的工具，MAGIK 展现了仅凭一段带标注的视频进行训练的能力，从而确保神经网络训练过程中的表征恰当且稳定 [5]。MAGIK 还将迁移学习用于迁移实验，使训练后的网络能够应用于其他细胞数据，同时不损失性能，正如 MAGIK GitHub 仓库所示 [9]。通过实施自监督算法，进一步推进这方面的发展值得期待。

MAGIK 配备了注意力机制，使用户能够了解框架在进行预测时关注数据结构的哪些具体方面，从而提供可解释性。这为分析动力学提供了一种可靠而高效的方法，也为发现生命系统运动中的新特征创造了机会。

MAGIK 已纳入显微镜成像深度学习软件包 DeepTrack 2.1 [10], ，因此正在持续开发和优化，重点提升可扩展性并改进部署。未来的工作将着重开发自蒸馏引导的图子采样技术 [11] 和资源高效的图神经网络架构 [12]。

**总结**

用于分析生物系统的深度学习框架（如 MAGIK）能够利用基于注意力机制的图神经网络，成功应对复杂拥挤环境中动态分析所面临的复杂性。MAGIK 可执行多种任务，包括细胞跟踪、确定局部和全局动力学，以及表征动态特征，而无需进行检测关联。尽管取得了这些进展，这些工具的广泛应用仍受到技术和解释方面挑战的阻碍。随着 MAGIK 框架在

DeepTrack 2.1 软件包中的持续开发，我们旨在解决这些局限，并提供一种可泛化的工具，以进一步提升数据结构的可解释性。

**参考文献**

1. Brückner, D. B., Arlt, N., Fink, A., Ronceray, P., Rädler, J. O., & Broedersz, C. P.《受限细胞迁移中细胞间相互作用动力学的学习》。美国国家科学院院刊 118(7), e2016602118, 2021年。 2. Ulman, V., Maška, M., Magnusson, K. E., Ronneberger, O., Haubold, C., Harder, N., ... & Ortiz-de- Solorzano, C.《细胞追踪算法的客观比较》。《自然·方法》14(12), 1141-1152, 2017年。 3. Chenouard, N., 等.《粒子追踪方法的客观比较》。《自然·方法》11(3), 281-289, 2014。 4. Muñoz-Gil, G., 等.《反常扩散解码方法的客观比较》。《自然·通讯》12(1), 6253, 2021年。 5. Pineda, J., Midtvedt, B., Bachimanchi, H., Noé, S., Midtvedt, D., Volpe, G., & Manzo, C.《几何深度学习揭示微观运动的时空特征》。Nature Machine Intelligence, 1-12, 2023。 6. Zhang, K., Zhu, Y., Wang, J., & Zhang, J.《面向图注意力网络的自适应结构指纹》。发表于《国际学习表征会议》，2020年。 7. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D.《借助 AlphaFold 实现高精度蛋白质结构预测》。《自然》596(7873), 583–589, 2021年。 8. Rudin, C..《停止为高风险决策解释黑箱机器学习模型，改用可解释模型》。《Nature Machine Intelligence》1(5), 206–215, 2019年。 9. Midtvedt, B., Helgadottir, S., Argun, A., Pineda, J., Midtvedt, D., & Volpe, G. DeepTrack 2。 https://github.com/softmatterlab/DeepTrack2（访问于2023年2月） 10. Midtvedt, B., Helgadottir, S., Argun, A., Pineda, J., Midtvedt, D., & Volpe, G.《基于深度学习的定量数字显微术》。《应用物理评论》8(1), 011310, 2021年。 11. Yang, Y., Qiu, J., Song, M., Tao, D., & Wang, X.《从图卷积网络中提炼知识》。发表于《IEEE/CVF计算机视觉与模式识别会议》，第7074-7083页，2020年。 12. Tailor, S. A., Opolka, F., Lio, P., & Lane, N. D.《我们需要各向异性图神经网络吗？》发表于《国际学习表征会议》，2021年。

# 21 — 单分子生物动力学定量分析

Carlo Manzo[1]

1. 科学、技术与工程学院，维克大学—加泰罗尼亚中央大学（UVic-UCC），西班牙维克

## 状态

生物过程的延时显微成像图像广泛用于观察活细胞和单细胞微生物的动力学与行为，应用范围涵盖分子生物学和细胞生物学的基础研究以及医疗实践。单分子成像和超分辨率显微镜技术的发展进一步提升了解析生物过程动力学的能力，使研究尺度延伸至亚细胞和分子层面[1]。因此，当前技术能够可视化细胞器、蛋白质和脂质在其天然环境中的运动。这些实验提供的观察结果有助于阐明细胞组分之间的相互作用，并揭示它们在信号传导和功能调节等基本过程中的作用。它们也有助于病原体感染和药物设计相关的生物医学应用。如今，许多研究实验室都配备了能够进行活细胞单分子成像的显微镜，因此这类实验已成为常规操作。然而，从这些实验中挖掘定量信息仍面临诸多挑战。

通常，分析流程分为两个步骤：单粒子跟踪和轨迹分析（**图21.1**）。第一步是将图像流中包含的信息转换为轨迹，即与成像粒子相关的特征（如位置、强度和尺寸）的时间序列。为开发用于此任务的自动化算法，人们投入了大量精力[2]。随着计算机视觉和多目标跟踪研究社区的进步，基于检测的追踪范式在单粒子跟踪中日益普及。因此，首先对图像进行处理以检测特征（检测），然后使用分配算法将不同时刻获得的特征连接起来，从而得到轨迹（关联）（**图21.1**）。

获得轨迹后，便使用统计方法对其进行分析，以提取有关粒子潜在动力学的信息，所用估计器包括均方位移（**图21.1**）。这些分析旨在提供有关所观察到的运输类型（布朗运动、定向运动、受限运动或异常运动）、与其他粒子和/或周围介质相互作用的详细信息。轨迹还可用于估计生物物理参数（例如扩散系数），或确定该运动是否符合给定的理论模型。

生命科学家拥有多种算法，可在活体生物系统中精确追踪单个粒子，也有许多方法可用于分析轨迹。近期也有人提出基于深度学习的方法，并声称其性能有显著提升。因此，需要对这些方法的性能进行客观评估，以帮助最终用户选择合适的工具。

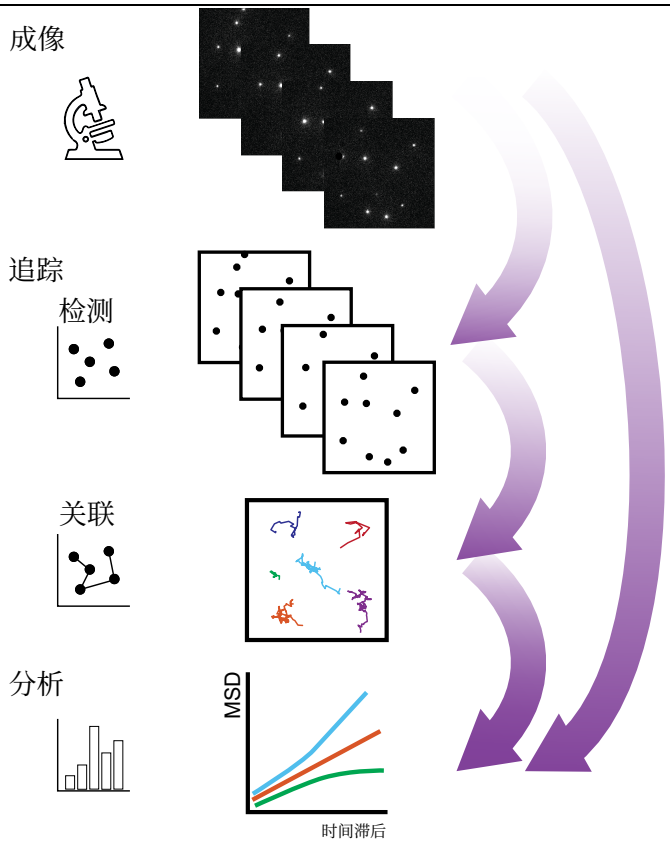


**图21.1. 活细胞单分子成像实验的分析步骤**。成像实验记录单个粒子的运动。在传统分析流程中，首先处理对应各个帧的图像以检测特征（检测）。然后，将特征关联起来以获得轨迹（关联）。最后，对轨迹进行分析以获得定量信息，例如通过计算均方位移（MSD）。与经典统计学相比，深度学习方法带来了显著改进，并且可能进一步实现从未经处理的视频中直接提取动态特征。

**当前与未来的挑战**

活细胞单分子成像实验通常记录异质环境中一部分单个粒子（分子、病毒、细胞器）的运动，旨在阐明其运输的分子机制及其与环境的相互作用。技术与仪器缺陷限制了实验条件（例如成像粒子密度和时间分辨率），并影响定量参数（例如定位精度和轨迹长度），最终影响对系统的精确表征 [2]。当前的一项挑战是部署能够提升传统分析流程中各个步骤所用方法性能的方法。近年来，机器学习和单分子定位显微术催生了大量单分子检测与定位方法，其中主要基于卷积神经网络 [3,4]。近期也有研究提出将深度学习方法用于轨迹连接任务 [5]。这些方法旨在对图像流进行自动化、无偏且可靠的分析。其性能的提升使得实验能够以更快的图像采集速率和更高的标记密度进行，从而提高时间分辨率和空间采样率。

由于活细胞内部发生的现象多种多样，研究人员提出了许多着眼于粒子运动不同方面的方法来分析轨迹。一个颇具挑战性的方面是表征单条轨迹，尤其是在实验条件

限制了轨迹长度或定位精度时。就在最近，采用机器学习的开创性研究表明，与经典统计学相比，机器学习取得了显著进步，并展现出多种架构（随机森林、卷积神经网络和循环神经网络）能够精确估计参数（例如布朗运动的扩散系数和异常扩散的反常扩散指数），并对轨迹进行分类；分类依据既可以是扩散模式（描述为不动/受限/布朗运动/定向运动，或亚扩散/布朗运动/超扩散），也可以是底层物理模型 [6-9]。这些成果促成了首届异常扩散（AnDi）挑战赛 [10], ，这项竞赛旨在客观评估这些方法，并推动了性能卓越的新方法的开发 [10]。挑战赛还设置了轨迹分割任务，用于检测动态行为的变化，例如与环境的相互作用所引起的变化。鉴于轨迹分割对生物系统表征具有重要意义，用于检测瞬态和短暂事件的轨迹分割方法预计将在近期进一步发展。

**应对挑战的科学技术进展**

为单粒子跟踪和轨迹分析开发的深度学习方法，在各种条件下都优于经典统计学方法，并有望放宽实验约束条件，使活细胞单分子成像能够以更快的速度提供更多信息。然而，若干已提出的方法仍停留在原理验证阶段，未能在实际实验中得到广泛应用。这一过程中可能存在多种影响因素。迄今为止推出的多数方法都涉及监督学习，但由于这类实验缺乏标注数据，训练和验证不得不依赖模拟数据集。尽管这些模拟具有现实性，但迁移学习应用于实际数据可能会引起最终用户的担忧，此外还有对黑箱模型的顾虑。与其他领域的做法一样，可以通过开展社区协作来推动这一进程，具体包括：i）制作公共数据集，用于评估新方法；ii）定期使用客观指标对现有方法进行基准测试，以确定最先进水平。此外还必须考虑到，为了达到最佳效果，深度学习架构必须在能够重现特定实验条件的模拟数据上进行训练。因此，建议实施用户友好界面，帮助非专家训练和微调模型。

为单粒子跟踪实施的深度学习方法在现有方法的基础上逐步取得了改进，但迄今仍受限于遵循标准分析流程，因而只是传统方法的数据驱动版本。通过开发能够直接从未经处理的视频中提取动态特征的“免追踪”方法，或可实现一次重大飞跃。这类方法可能基于几何深度学习，或基于融入信息丰富的先验——即在观测数据基础上加入物理约束和归纳偏置——的物理学信息机器学习架构。事实上，这些架构除了能够实现更快的训练和更准确的预测外，还将提升模型的可解释性。直接使用原始数据还可防止在分析流程不同步骤中产生的误差不断传播，而这些误差最终会影响动态信息的提取。

无需带标签数据集的技术不断发展，或将进一步加速深度学习在真实数据中的应用。无监督学习和自监督学习方法都在飞速发展。结合 Transformer 等创新网络架构，自监督技术已展现出从未标注数据中学习表征的能力

，并在基于图像的分析中取得了出色成果。因此，这些技术为开发新一代单粒子追踪与分析工具提供了一种很有前景的方法。

## 总结

深度学习革命为活细胞单分子成像的定量分析带来了令人振奋的前景。然而，尽管近期开发的工具已展现出性能提升，它们仍面临重要挑战，需要克服这些挑战，才能广泛采用数据驱动方法取代经典工具。因此，建议推动社区协作，开展方法的基准测试与验证 [2,10]。突破基于检测的追踪范式，直接从原始数据中挖掘信息，或许能够进一步提升性能。将物理约束和归纳偏置融入深度学习模型，可以提升性能和可解释性。可以预见，无需带标签数据集的新技术将进一步推动这一领域的发展，使人们能够研究活细胞中的分子动力学，突破现有能力的限制。


## 致谢

*CM* 感谢由 *MCIN/AEI/10.13039/501100011033* 资助的 *RYC-2015-17896* 项目以及*“ESF Investing in your future”*提供的支持；感谢由 *MCIN/AEI/10.13039/501100011033/* 和 *FEDER “ERDF A way of making Europe”*资助的 *BFU2017-85693-R* 和 *PID2021-125386NB-I00* 项目；并感谢由加泰罗尼亚政府资助的 *AGAUR 2017SGR940* 项目。


## 参考文献


1. C. Manzo 和 M. F. Garcia-Parajo，“单粒子追踪进展综述：从方法到生物物理学见解”，《物理学进展报告》 78, 12, 124601, 2015年。2. N. Chenouard 等，“粒子追踪方法的客观比较”，《自然·方法》 11(3), 281–290, 2014年。3. J. M. Newby、A. M. Schaefer、P. T. Lee、M. G. Forest 和 S. K. Lai，“卷积神经网络实现亚微米尺度粒子在二维和三维中的自动检测与追踪”，《美国国家科学院院刊》 115(36), 9026–9031, 2018年。4. A. Speiser 等，“深度学习实现快速、高密度且高精度的单分子定位”，《自然·方法》 18(9), 1082–1090, 2021年。5. J. Pineda 等，“几何深度学习揭示微观运动的时空指纹”，*Nat. Mach. Intell.* 5, 71–82, 2023年。6. N. Granik 等，“利用深度学习进行单粒子扩散表征”，《生物物理学杂志》 117(2), 185–192, 2019年。7. S. Bo、F. Schmidt、R. Eichhorn 和 G. Volpe，“利用循环神经网络测量反常扩散”，《物理评论*E*》 100(1), 1–6, 2019年。8. P. Kowalek、H. Loch-Olszewska 和 J. Szwabiński，“单粒子追踪数据中的扩散模式分类：基于特征的方法与深度学习方法的比较”，《物理评论*E*》 100(3), 32410, 2019年。9. G. Muñoz-Gil、M. A. Garcia-March、C. Manzo、J. D. Martín-Guerrero 和 M. Lewenstein，“通过机器学习进行单轨迹表征”，*New J. Phys.* 22(1), 013010, 2020年。10. G. Muñoz-Gil 等，“反常扩散解码方法的客观比较”，《自然·通讯》 12(1), 6253, 2021年。

# 22 – 浮游生物生命轨迹

Harshith Bachimanchi[1], Erik Selander[2]

1. 哥德堡大学物理系，瑞典 2. 哥德堡大学海洋科学系，瑞典

## 状态

生命可能于38亿年前起源于海洋 [1]。早期蓝细菌遍布海洋，并使大气充满氧气 [2]。自那时起，浮游植物——陆生植物的微观对应物——便在地球生态系统中发挥着至关重要的作用。浮游植物产生地球上约一半的氧气，并从二氧化碳中固定50拍克（Pg）碳，其量约为化石燃料每年总排放量的五倍 [3], 。然而，由于体型较小，我们对水生食物网低层许多方面的理解仍然有限。

为了更深入地有效研究这些生物，我们依赖基于显微镜的方法。其中一些应用场景包括浮游生物检测与计数、浮游生物分割与物种分类，以及对浮游生物细胞进行长期追踪。然而，考虑到浮游生物类群极其多样，单细胞的人工识别是一项劳动密集型工作，需要由训练有素的分类学家完成 [4]。这也限制了我们以足够的时间和空间分辨率监测和追踪浮游生物群落的能力。在过去十年中，人们开发了许多基于计算机视觉的成像方法，用于从显微图像中检测对象。这些技术涵盖了传统方法（采用分割和二值阈值化方法）以及基于深度学习的更先进技术 [5]。

近年来，特别是基于深度学习的方法在浮游生物分析中取得了显著成功。作为传统方法的替代方案，深度学习为研究不同环境中的微生物提供了客观的方法。例如，Faster R-CNN、U-Net 和 YOLO 等一系列卷积神经网络（卷积神经网络）被广泛用于目标检测、分类和分割问题 [5]。与传统方法相比，这些网络中的卷积层有助于识别图像中细胞的高层次和低层次形态学特征。一类称为生成对抗网络（生成对抗网络）的生成模型正被用于根据现有数据生成新的浮游生物图像数据，以更好地评估现有模型，并进一步提高测量的准确性 [6]。人们还在利用深度学习解决定量跟踪浮游生物和生物量估计等新问题 [7]。

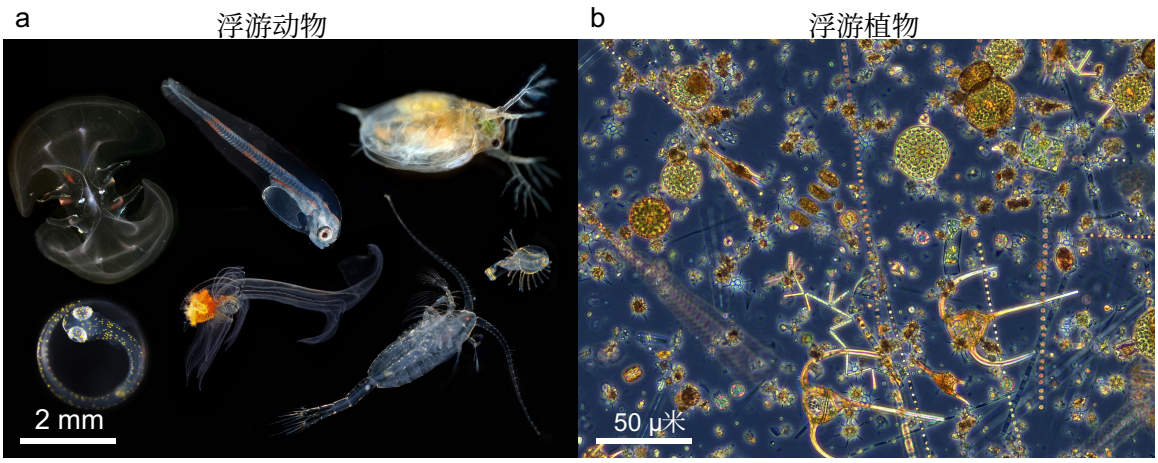


**图22.1 浮游生物**。浮游动物（左）和浮游植物（右）的示例。浮游生物是一个广义术语，涵盖形态多样、几何形态复杂且生命周期阶段各异的生物体，这给人工智能驱动的图像分类和分割带来了挑战。右侧照片由 Malin Mohlin 拍摄。

**当前与未来的挑战**

人工智能的快速发展推动了其在浮游生物分析中的应用，例如自动识别以及大规模、高通量的原位监测工作。与此同时，需求驱动型开发也在不断推进，以微调和改进现有方法，并找出能够利用有限标注数据的技术，而有限的标注数据通常是基于深度学习的方法所面临的瓶颈。下面我们将讨论最紧迫的挑战。

数据的人工标注：训练深度学习网络需要标注数据。这意味着，如果图像中包含生物体，就需要专家根据文献中的分类学知识和经验，将其鉴定到物种级别。这项工作十分耗时，而且往往容易出错。无监督和自监督深度学习算法可以解决数据人工标注所面临的问题。例如，可以通过考察变分自编码器的潜在空间分布，对生物体进行无监督分类，然后由分类学专家进一步评估预测得到的聚类结果。

实际应用：深度学习在浮游生物生态学中的应用研究，大多局限于检测、计数和分割问题。要更好地理解浮游生物动态，就需要将其拓展到更多实际应用场景。例如，需要开发基于人工智能的跟踪算法，以便在较长时间内追踪单个浮游生物。捕食和资源利用等个体间相互作用的机制性理解，仍是有待探索的领域，而深度学习算法正不断推动这一领域的边界。

实际限制：在野外实验和船载监测中，浮游生物群落的采样时间分辨率和空间分辨率都过低。这意味着海洋中的浮游生物群落演变迅速，暴发等短暂特征可能在两次离散采样之间轻易形成并消失。除了基础设施方面的困难，图像分析速度也是一项瓶颈。随着配备基于人工智能的实时分类功能、无需人工标注的海洋剖面测量仪器不断发展，便可以按照适当的空间和时间分辨率对较低营养级的海洋食物网进行采样。此外，由于浮游生物细胞的形态彼此重叠，准确分类也面临挑战（**图22.1**）。尽管有些可以

被准确分类，但对于其他一些对象，即使训练集规模很大，形态重叠仍会妨碍准确分类。

可用性：尽管深度学习方法正变得越来越易于获取，但它们大多尚不能用于生产，也没有封装成开箱即用的界面。朝这一方向作出的努力，将有助于编程知识有限的技术人员和用户。

**应对挑战的科学技术进展**

下面我们将讨论深度学习领域的最新进展。这些进展可用于应对浮游生物生态学中的一些挑战，并有望为新的应用开辟道路。

标注数据：获取带标注的真实值数据，是许多深度学习应用中公认的难题。近年来，无监督和自监督深度学习算法在这方面展现出了一些令人鼓舞的成果。Cycle-GAN 属于生成对抗网络家族，广泛用于将一个域的图像风格迁移到另一个域，即便图像和真实值数据并非成对提供也能实现。从浮游生物图像分割的角度来看（**图 22.2**），这表明在人工标注数据有限时，可以使用 Cycle-GAN 执行分割任务。训练 Cycle-GAN 时，浮游生物图像与相应的分割掩膜无需配对，因此可以使用形态相似的合成掩膜，作为真实浮游生物图像的真实值数据。

此外，浮游生物的显微成像数据本身也可以通过生成对抗网络 [6], 或模拟类浮游生物对象来合成。通过采用最先进的计算光学，并复现实验设备的光学性质（这些设备用于记录数据），可以大规模生成具有代表性的显微图像 [8]。合成数据的优势在于，真实值预先已知，且易于控制。这有望克服数据人工标注带来的挑战，尤其是在分割任务中，细致标注细胞边界至关重要。例如，**图 22.2**所示的浮游生物物种分割结果，是由一个基于模拟浮游生物数据训练的U-Net模型获得的。除分割外，该方法还可根据形态特征进行细胞分类。

近年来，自监督深度学习算法在对象分割和检测任务中也展现出了一些令人鼓舞的成果。与基于标注样本进行学习的监督算法不同，自监督算法使用的标签是输入图像经过变换后得到的图像本身。尤其是视觉Transformer（ViTs）采用基于注意力的机制来突出输入图像中的不同区域，在许多计算机视觉任务中表现优于卷积神经网络 [9]。作为视觉Transformer家族的一员，DINO（无标签蒸馏）是一种自监督视觉Transformer [10], ，能够在没有任何标注数据的情况下，以更高的准确率成功分割图像中的对象。考虑到浮游生物形态的多样性，自监督视觉Transformer可用于复杂分类群的分割和分类。

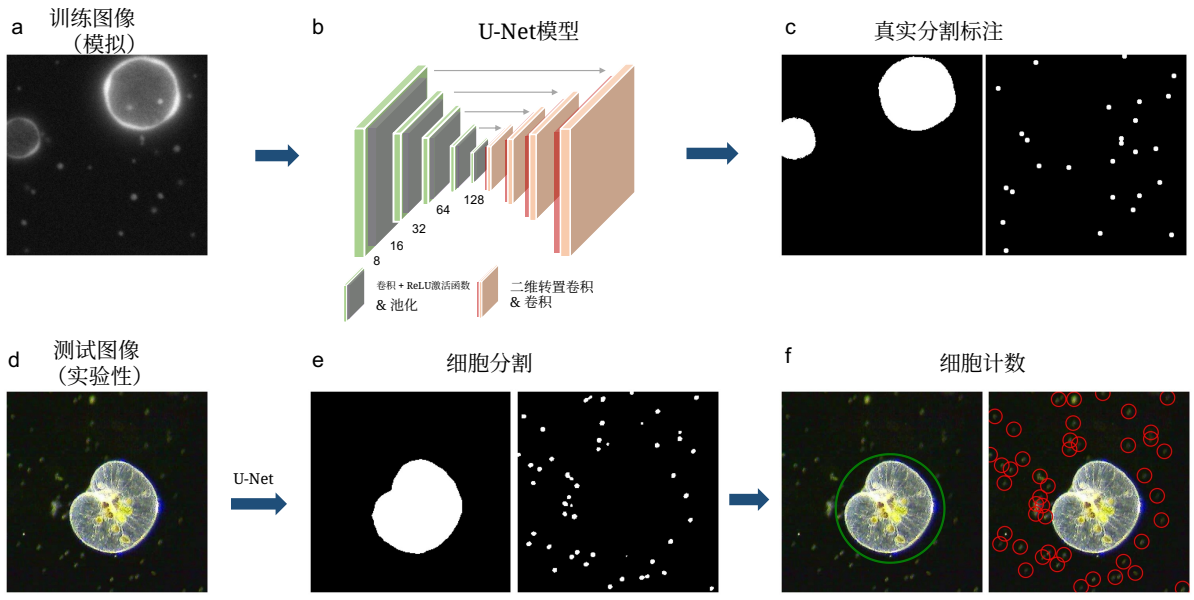


**图 22.2 使用 U-Net 进行浮游生物分割与计数。**（**a**）包含浮游生物物种夜光藻（较大的细胞）和杜氏盐藻（较小的细胞）的显微图像，经预训练的（**b**）U-Net模型处理。（**c**）U-Net预测的单个细胞分割结果。（**d**）从 U-Net 输出中检测到的细胞：夜光藻（绿色）和杜氏盐藻（红色）。

## 总结

人工智能驱动的显微技术是一个快速发展的研究领域。对单个浮游生物的自动识别、分割和追踪能够提供超越当前认知的机制性见解，彻底改变我们对水生食物网底层的理解，并让我们能够在相关的时空尺度上观测大量生物体。此外，数字全息术等成熟技术与深度学习算法的近期结合，将有助于实现对单个浮游生物及其相互作用的分辨，从而在未来几年推动浮游生物生态学的发展。

## 参考文献

1. E. G. Nisbet 和 N. H. Sleep，“早期生命的栖息地与本质”，*Nature* **409**(6823), 1083–1091, 2001年。2. T. W. Lyons、C. T. Reinhard 和 N. J. Planavsky，“地球早期海洋和大气中氧气的兴起”，*Nature* **506**(7488), 2014年。3. C. B. Field、M. J. Behrenfeld、J. T. Randerson 和 P. Falkowski，“生物圈的初级生产：整合陆地与海洋组成部分”，《科学》 **281**(5374), 237–240, 1998年。4. S. Sunagawa、S. G. Acinas、P. Bork、C. Bowler、D. Eveillard、G. Gorsky、L. Guidi、D. Iudicone、E. Karsenti、F. Lombard、H. Ogata、S. Pesant、M. B. Sullivan、P. Wincker 和 C. de Vargas，“Tara Oceans：迈向全球海洋生态系统生物学”，《*Nature Reviews Microbiology*》 **18**, 8, 2020年。5. P. Ma、C. Li、M. M. Rahaman、Y. Yao、J. Zhang、S. Zou、X. Zhao 和 M. Grzegorzek，“微生物图像分析中目标检测技术的前沿综述：从经典方法到深度学习方法”，《*Artificial Intelligence Review*》, 2022年。6. Y. Li、J. Guo、X. Guo、Z. Hu 和 Y. Tian，“基于对抗学习和密集连接深度学习模型、面向类别不平衡分布的浮游生物检测”，《海洋科学与工程杂志》 **9**(6), 2021年。7. H. Bachimanchi、B. Midtvedt、D. Midtvedt、E. Selander 和 G. Volpe，“全息显微术与深度学习揭示的微型浮游生物生活史”，《*eLife*》 **11**, e79760, 2022年。

8. B. Midtvedt、S. Helgadottir、A. Argun、J. Pineda、D. Midtvedt 和 G. Volpe，“基于深度学习的定量数字显微术”，《应用物理评论》 **8**(1), 011310, 2021年。9. A. Dosovitskiy 等，“一张图像胜过 16×16 个词：用于大规模图像识别的 Transformer。” arXiv 2010.11929, 2021年。10. M. Caron 等，“自监督视觉 Transformer 中涌现的特性。” arXiv 2104.14294, 2021 年。

# 23 —微生理系统

Antoni Homs-Corbera[1]

1. 研发部，Cherry Biotech SAS，巴黎，法国

## 状态

微生理系统（MPS）处于微流体学与生物学的交界处，是有助于深入理解人体生物学、生理学和病理生理学的有前景工具。此类系统也称为器官芯片（OoC）设备，利用微尺度上的物理和化学现象，能够重现生物细胞与生物材料组合体及其在人体中的条件[1]。它们提供模拟器官的功能单元，这些单元可以相互连接[2]，，如同自然系统中的血液和淋巴流，从而构建简化的人体模型，帮助更好地理解复杂的多因素行为[3]。

MPS 是一种混合设备，实验过程中细胞和生物材料的状态对结果的准确性和相关性起着至关重要的作用。要确保空间条件随时间变化并监测实验事件，就需要以非侵入方式收集、管理和处理复杂数据，同时至少在功能层面上保持生物体外模型（表型）的有效性。MPS 本身具备提供大量时序数据的能力，并有望集成多种传感器[4,5]，以及采用先进的显微技术进行成像[6]。这为控制和分析多个相互连接、协同工作的单元的生物复杂性提供了手段，从而深入了解其系统性响应。

运用机器学习技术[4,7] 来控制和评估微生理系统受到药物化合物等刺激时的特定行为，可提供一种可靠工具，用于预测潜在新疗法的效果、推动疗法研发、实现个性化医疗，或发现那些因需同时评估的数据复杂且量大而被人眼忽略的过程。这或将为制药和生物技术产业带来范式转变，产生重大的积极社会经济影响，并至少部分取代现有的体内动物模型[3,8,9]。机器学习、微生理系统、传感与成像技术目前的同步进展，为开发自主微生理系统平台创造了肥沃的土壤，使其具备必要的高通量和鲁棒性，能够作为真正的人体生理与病理生理模拟器。尽管目前仍存在局限，这些技术的结合已取得令人鼓舞的科学成果[7]。**图23.1**展示了此类系统的一个工作示例。

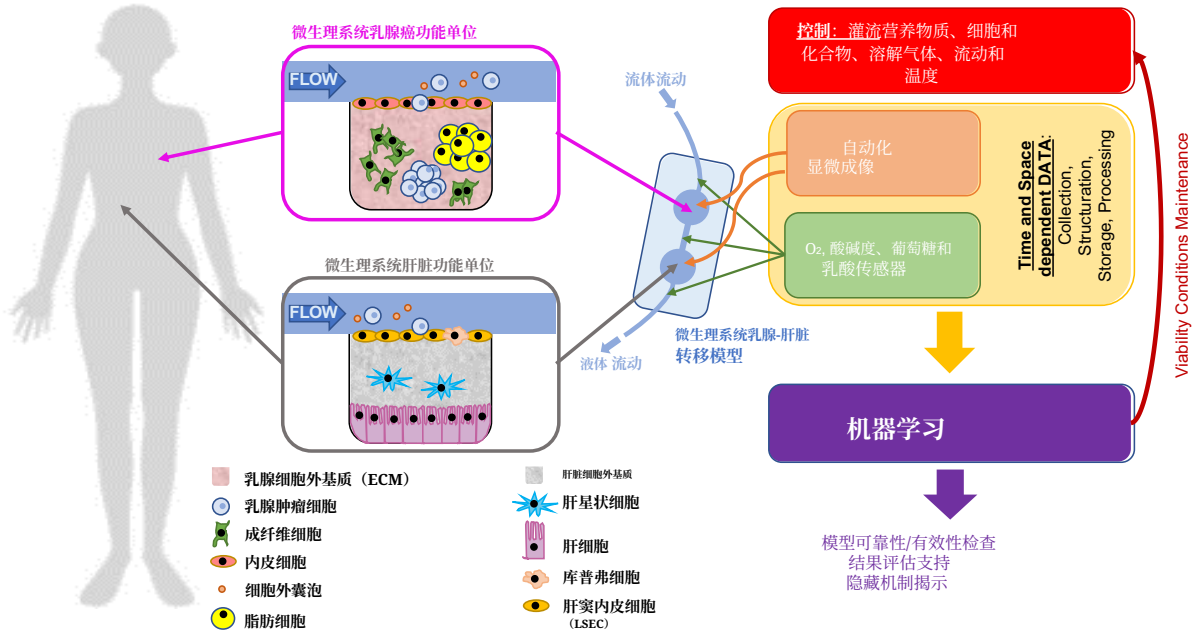


**图23.1. 一个融入机器学习的微生理系统（MPS）示例。**该微生理系统旨在揭示乳腺癌向肝脏转移的机制，未来有望用作模型，以寻找新的疗法或实现针对这种疾病的个性化治疗。

## 当前与未来的挑战

人体生理学高度依赖局部理化参数。对于微生理系统的长期研究，精确控制至关重要，能够确保获得可靠且有意义的数据。若要大规模实施这种控制，尤其是用于治疗筛选等潜在应用，就不能依赖人工操作。能够实时决策并对微生理系统参数进行微调和维持的自动控制系统至关重要；这些参数包括溶解氧含量、酸碱度、温度、流体流动特征或诱导的机械力（**图23.1**）。此外，这些系统还可以评估系统对特定刺激的响应，并根据监测到的培养基成分、代谢物及其他已发生的事件，在每次实验后提供微生理系统模型有效性的指标。

将传感与成像技术同机器学习方法相结合，为在这些复杂系统中实现如此程度的控制与评估提供了一种前景广阔的工具 [5-7]。然而，必须谨慎选择传感与成像技术，以免改变微生理系统本身的生物学特性。应避免会引入偏差的化学和物理条件（例如光毒性、基因改变、分子吸收），以确保模型具有活力且贴近实际。借助机器学习技术，也可以消除其中一些不良影响；这些技术利用了显微图像分析领域的进展，例如虚拟染色 [10]，可在某些应用中避免使用化学染色并消除光毒性。

然而，采集并标注海量输入数据，以训练未来的自主决策系统，是一项繁琐且耗费大量人力的工作，并且容易受到一定偏差的影响。此外，持续监测这些生物模型的发育和功能，意味着需要实时比较并整合来自异质条件的多个数据源，这本身就是一项挑战。机器学习评估系统应能够对不同维度范围内表现出的时间依赖性事件进行分类。另一个重大挑战是同时评估细胞层面的特征，例如表型、迁移（如

免疫性迁移和肿瘤性迁移）或远距离通信（如细胞外囊泡），以及整体上更大规模的多细胞功能单元和全身反应。

**图23.1**所提出的模型展示了微生理系统中可达到的复杂程度。近期研究发现，乳腺癌细胞分泌的细胞来源囊泡会迁移并激活肝微生理系统中的肝窦内皮细胞（LSEC），促使血管屏障遭到破坏，并揭示了转移机制 [11]。在成像方面，除了常规显微镜成像外，可能还需要更高分辨率的成像，以追踪肝脏LSEC中窗孔（即纳米结构孔隙）的形态和密度。

针对微生理系统的多源、多维时变数据自动化研究仍处于起步阶段。目前，机器学习已用于自动化单传感器测量、成像系统，或识别药物筛选流程中的关键候选对象，但要实现可靠、实用且可行的多重复杂微生理系统，仍有很长的路要走。

**应对挑战的科学技术进展**

机器学习技术已在简单的微生理系统中展现出其价值和可行性，可用于生成虚拟染色、研究细胞表型或追踪迁移事件 [7]，无论采用监督方法还是非监督方法。然而，迄今尚未证明机器学习技术能够控制微生理系统微环境中的多个参数，以确保其活性和表型。此外，用于评估微生理系统的数据源有限，例如仅采用一种延时成像方法，或仅结合数量有限的分析传感器，这削弱了该方法的真正潜力，也忽略了重要的生理及病理生理数据。

微生理系统（MPS）系统在可用性、可重复性、高通量和鲁棒性方面的改进，必须与成像、传感和机器学习进展齐头并进。当前发展的主要目标应是提供具备这些特性的全自动微生理系统（MPS）系统，以便为研究人员持续提供标准化、条件受控且可靠的数据。这将有助于测试和优化不同的机器学习策略与机制，从而充分发挥这些技术的潜力。它还将促进高通量分析，这对于打造预期中的、旨在颠覆医疗保健领域的系统至关重要。最终，还可以纳入通过采样微生理系统流体和组织获得的其他数据（如遗传信息），或通过对人体样本进行医学评估获得的数据，以改善治疗评估目标所对应的结果。

从纯粹的机器学习算法角度来看，可以探索数据增强、半监督学习和迁移学习，以减少训练所需的数据量。同样，也可以利用自动数据标注来降低人工标注的成本。此外，应用于微生理系统领域的深度学习算法有特定需求，需要开发新颖的定制化架构和布局设计。必须探索不同的设计自动化和提高效率的方法，并防止在任何迭代式升级过程中出现灾难性干扰。此外，这些配备传感器和成像设备的系统收集了大量实时数据，因此需要准确研究如何在确保准确性的同时，通过压缩模型体积来提高推理速度。同样，必须谨慎选择用于训练深度学习算法和评估微生理系统的硬件，并优化整个系统的性能。最后，可解释深度学习

技术应得到开发，以减轻“黑箱”效应，从生物学角度促进生成有意义的物理学解释。

**总结**

微生理系统与机器学习技术的结合是一个新兴领域，具有巨大的潜力，可促进人们对人体生物学的理解、医疗疗法的开发以及个性化医疗。理想情况下，未来将机器学习技术应用于这些多参数复杂系统，应能通过无监督学习方法提供目前尚无法获得的生物学洞见。另一方面，将已知且经过表征的治疗性化合物库所得结果与新型化合物的结果以及真实的体内结果进行比较，这些算法也有望在药物发现和治疗个性化方面实现较高的预测水平。最终，研究中提供组织或细胞的人体受试者的医学和生物学数据，以及通过其他方式获得的数据，也可纳入机器学习模型，为治疗发现和个性化医疗应用提供额外信息。

未来几年，推动微生理系统数据源自动化和标准化，并提升实验稳健性、高通量和可扩展性的工作，应能改善机器学习在这一领域的成果。获得受控条件下的大规模可靠数据至关重要。此外，在设计和探索任何机器学习或深度学习方法的策略时，都必须考虑微生理系统设备的特殊性、其数据异质性及其多种来源。

**致谢**

作者谨向欧盟委员会表示感谢，感谢其通过不同的倡议和计划（*MSCA-ITN-2018-812780*、*HORIZON-EIC-2021-PATHFINDEROPEN-01-01- 101046928*、*HORIZON-EIC-2021-PATHFINDEROPEN-01-01-101046620*、*HORIZON-EIC-2022-TRANSITIONOPEN-01-101099775*），持续为 *Cherry Biotech SAS* 在本文所涉领域的研究与创新提供资金支持。

**参考文献**

1. P. Zarrintaj, M. R. Saeb, F. J. Stadler, M. K. Yazdi, M. N. Nezhad, S. Mohebbi, F. Seidi, M. R. Ganjali, M. Mozafari, “人体器官芯片：最先进水平综述、当前前景与未来挑战”, *Adv. Biology* **6**, 2000526, 2022年。2. S. Lee, J. Ko, D. Park, S.-R. Lee, M. Chung, Y. Lee, N. L. Jeon, “基于微流控的血管化微生理系统”，*Lab Chip* **18**, 2686-2709, 2018年。3. A. Roth, “用于药物开发的人体微生理系统”，*Science* **373**(6561), 1304– 1306, 2021年。4. A. T. Young, K. R. Rivera, P. D. Erb, M. A. Daniele, “微生理系统监测：整合传感器与实时数据分析，迈向自主决策”，*ACSSensors* **4**(6), 1454–1464, 2019年。5. H. Kavand, R. Nasiri, A. Herland, “微生理系统的先进材料与传感器：聚焦电子与电光接口”，*Adv. Mater.*, 2107876, 2022年。6. S. Peel, M. Jackman, “微生理系统成像：综述”，Am. J. Physiol. Cell Physiol., 320 (5), pp. C669-C680, 2021年。https://doi.org/10.1152/ajpcell.00186.2020 7. J. Li, J. Chen, H. Bai, H. Wang, S. Hao, Y. Ding, B. Peng, J. Zhang, L. Li, W. Huang, “基于深度学习的器官芯片概述”，*AAAS Research* **2022**, 9869518, 2022年。

8. S. Youhanna, A. M. Kemas, L. Preiss, Y. Zhou, J. X. Shen, S. D. Cakal, F. S. Paqualini, S. K. Goparaju, R. Z. Shafagh, J. U. Lind, C. M. Sellgren, V. M. Lauschke, “用于药物发现与开发的器官型和微生理人类组织模型——当前最先进水平与未来展望”，*Pharmacological Reviews* **74**(1), 141–206, 2022年。9. L. Ewart, E.-M. Dehne, K. Fabre, S. Gibbs, J. Hickman, E. Hornberg, M. Ingelman-Sundberg, K.-J. Jang, D. R. Jones, V. M. Lauschke, U. Marx, J. T. Mettetal, A. Pointon, D. Williams, W.-H. Zimmermann, P. Newham, “在药物发现中应用微生理系统以提升安全性评估”，*Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **58**(1), 65-82, 2018年。10. S. Helgadottir, B. Midtvedt, J. Pineda, A. Sabirsh, C. B. Adiels, S. Romeo, D. Midtvedt, G. Volpe, “利用深度学习从明场细胞图像中提取定量生物学信息”，*Biophysics Rev.* **2**, 031401, 2021年。11. J. Kim, C. Lee, I. Kim, J. Ro, J. Kim, Y. Min, J. Park, V. Sunkara, Y.-S. Park, I. Michael, Y.-A. Kim, H. J. Lee, Y.-K. Cho, “三维人类肝脏芯片模拟乳腺癌来源的细胞外囊泡诱导的转移前生态位形成”，*ACS Nano* **14**(11), 14971–14988, 2020年。

# 24 — 自学习热流体学

Martin Fränzl[1], Tobias Thalheim[1], Frank Cichos[1]

1. 莱比锡大学彼得·德拜软物质物理研究所

## 状态

在微流体学中，液体和悬浮物体在微小通道内受到操控，以触发化学反应、组装新材料、以高通量分析单细胞，或模拟芯片器官 [1]。微流体学在生物学、化学、药物设计和医学等领域的创新潜力，源于这些微小尺度上卓越的质量与热量传输能力，以及便于实验操作和控制的特点。 大多数流体操控方法基于压力，需要在复杂通道系统的入口/出口施加外部压力差。这类方法可以实现复杂的流动设计，但必须让液体流经整个通道才能影响局部组成；不过，也存在基于电动（电泳）驱动的其他局部方法。近年来，人们开发出可通过光进行远程控制的流体环境中纳米物体和流动操控新技术，其作用不止于光镊产生的力。这些方法利用局部温度梯度，通过热泳 [2], 、热渗透 [3], 、热黏性效应 [4] 或其他次级效应 [3] ，驱动悬浮在液体中的物种迁移，统称为热流体学（**图2**）。借此，人们开发出操控胶体 [5] 和单分子 [6] 的方案，甚至为研究蛋白质聚集 [7]开辟了新途径。简单流体狭缝孔中液体与固体边界处的温度梯度，可生成局部流动模式，从而引导、操控和分离悬浮在液体中的对象，而无需任何外部压力 [3]。热黏性效应则可通过动态局部加热液体来产生动态流动。由于微流体系统尺寸微小，热传递速度很快，为流体操控中的反馈控制技术铺平了道路 [8]。综合运用这些效应，只需简单地施加光，就能在微流体系统中实现搅动、混合、分离、压缩，甚至加热和冷却。然而，微流体学领域仍缺乏大规模集成与应用。

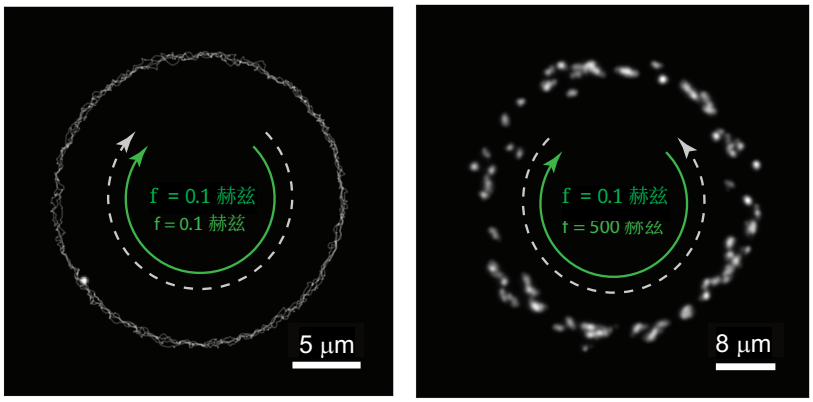


**图24.1 胶体通过热渗流产生的运动**。由受控热渗流（左）以及热黏性流与热渗流组合（右）引起的胶体运动。改编自参考文献 [3]。

## 当前与未来的挑战

液体相组成日益复杂、悬浮其中的对象日趋多样、与微流控应用特定目标相结合的多模态传感技术不断发展，这些都使人们需要新的基于机器学习的分析与控制方案，以充分发挥微流体学的优势

微流体学 [1]（**图24.2**）。例如，在各种应用中经常遇到的一个当前挑战是样品中出现异质性，这会妨碍对分子种类的数据分析。例如，在研究分析中蛋白质聚集以了解神经退行性疾病的起因时，这类异质样品就十分重要 [7]。

对异质集成方法进行实验研究，得到的系综平均受数量最多的物种主导，而这些物种未必是特定疾病中最重要的物种。热流体学的新型局部方法可按尺寸甚至按物种进行选择性作用，从而使不同物种在空间上分散开来。然而，它们与温度场的相互作用往往尚不清楚。机器学习方法，例如用于对样品中的物种进行实时视觉分类和定位的方法 [9] 结合强化学习 [10]，似乎非常适合应对这一挑战，从而实现热流体学的自学习变体。结合实时局部光谱信息，在提高局部同质性的同时增加空间异质性，将很快催生出新的可重构自学习工具，以高度灵活的方式解决化学、医学或物理问题。

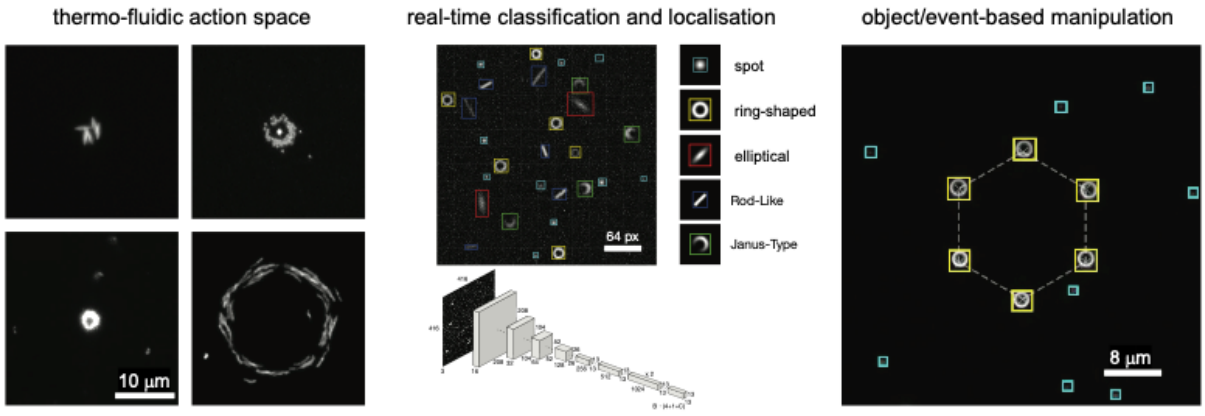


**图24.2 基于机器学习的热流体控制**。基于机器学习的热流体控制利用物种，其动作空间由对象和液体的热梯度诱导漂移决定，并结合对象在空间中的分类与定位，以及因学习过程而具备适应性的、基于对象和事件的操控。改编自参考文献 [3] 和 [9]。

**应对挑战的科学技术进展**

为应对这些挑战，主要进展体现在两个方面：一方面，将热流体方法大规模集成到传统微流体系统中并进行测试。这包括使用简单的吸收层，引发由激光控制的局部温度升高，从而产生强边界流；还可将其与电场等其他场结合，进一步增强热电流体动力学效应。这些方法应与压力驱动流结合研究，因为它们将带来许多新的方案，例如温度驱动流场分馏。另一方面，本文提出的关键方法是利用可自由配置的动态温度场，并结合新开发的机器学习方法（循环网络、卷积神经网络、强化学习），以高灵敏度和高速度捕捉具有化学分辨率的局部信号。机器学习技术利用温度扰动的局部特性，实现目标驱动微流控。这还需要高度灵敏的检测技术，最好能实时提供化学分辨率，从而支持机器学习（例如深度强化学习）所提出的自适应改进。这类高灵敏度实验技术可能包括新型光热红外显微术；该技术近期革新了红外显微术，但仍有待应用于微流体领域。

**总结**

局部热流体效应有望推动机器学习驱动的微流控新方法，因为它们提供了丰富的操作手段，可用于操控几乎任何类型流体中的悬浮物体，也可诱导局部流动，以分离或混合不同组分。虽然物种与温度场之间的个体间相互作用可能尚未得到详细了解，但在实验过程中通过机器学习选择操作手段以实现特定结果，将为操控物种开辟新途径，应用于物理学、化学、生物学和医学领域。

**致谢**

我们感谢 *SFB TRR102*“多重约束下的聚合物：受限和可控的分子有序性与迁移率”项目的支持（德国研究联合会项目编号：*189853844*）。

**参考文献**

1. Galan E. A., Zhao H, Wang X., Dai Q., Huck W. T. S., & Ma S.《智能微流控：机器学习与微流体学在材料科学和生物医学中的融合》，物质 **3**(6), 1893-1922, 2020年。2. Würger A. (2010)。《胶体中的热非平衡输运》，*Reports on Progress inPhysics* **73**(12), 2010年。3. Fränzl M. & Cichos F.《光诱导热渗流对纳米物体的流体动力学操控》，《自然·通讯》 **13**, 656, 2022年。4. Weinert F. M., Kraus J. A., Franosch T., & Braun D.《行波沿线热黏性膨胀诱导的微尺度流体流动》，*Physical Review Letters* **100**, 164501, 2008年。5. Lin L., Peng X., Mao Z. , Wei X., Xie C., & Zheng Y. 《界面熵驱动的热泳镊子》，*Lab Chip* **17**, 3061–3070, 2017年。6. Braun M., Bregulla A. P., Günther K., Mertig M., & Cichos, F.《由动态非均匀温度场捕获的单分子》，*Nano Letters* **15**, 5499–5505, 2015。7. Fränzl, M., Thalheim T., Adler J., Huster D., Posseckardt J., Mertig M., & Cichos F. 《用于单根淀粉样纤维和蛋白质聚集研究的热泳捕获》，《自然·方法》 **16**, 611-614, 2019年。8. Braun M. & Cichos F.《光学控制的单个纳米物体热泳捕获》，*ACS Nano* **7**(12), 11200–11208, 2013年。9. Fränzl, M. & Cichos, F.《基于单次检测卷积神经网络的活性粒子反馈控制》，*Scientific Reports* **10**, 12571, 2020年。10. Muiños-Landin S., Fischer A., Holubec V. & Cichos F.《人工微型游动者的强化学习》，*Science Robotics* **6**(52), eabd9285, 2021年。

# 25 — 数字病理学中的深度学习

Carolina Wählby[1]

1. 信息技术系与SciLifeLab，乌普萨拉大学，瑞典

## 状态

100多年来，显微镜辅助视觉评估一直是诊断癌症和其他疾病的重要手段，评估对象包括活检和细胞学涂片等组织样本。对疾病严重程度进行分级对于患者的临床管理至关重要。然而，这是一项艰巨的任务，病理学家之间的差异会带来临床挑战，导致治疗不足或过度治疗，进而影响患者发病率、死亡率和医疗成本。早在20世纪30年代，病理学中就已出现机器辅助诊断的初步尝试。近年来，高效的载玻片扫描仪和自动化样本处理推动了数字病理学的发展，也促进了基于深度学习的图像分析系统的开发，以协助病理学家评估样本 [1]。这类系统有望提高癌症筛查的准确性和成本效益，并为解决病理学家间差异过大的问题提供一种可行方案 [2]。全球性挑战赛取得了一些最令人瞩目的成果，例如PANDA挑战赛 [3],，其训练数据和测试数据来自多家医院和多个国家，并由此推动了基于多种不同模型集成的深度学习解决方案的发展，这些方案采用了不同的数据预处理方法和不同的神经网络架构等。

与此同时，基于深度学习的自动化系统通常对样本间变异性以及源于样本采集、样本处理、染色和扫描过程中产生的伪影非常敏感。人类能够非常高效地适应此类变异性，而一些极其细微的变化有时甚至无法被人眼察觉，却可能对自动化检测和分级产生灾难性影响。诸如PANDA挑战赛这样的大型多中心工作，只需确保训练期间纳入的大量数据尽可能涵盖模型在临床部署期间可能遇到的样本变异，便可克服这些问题。然而，此类大规模工作成本高昂，而且对于样本可用性有限的罕见病而言，可能难以组织。另一个瓶颈是训练数据的可靠性，这在很大程度上取决于病理学家对样品进行视觉标注时存在的病理学家间差异。借助稳健的图像归一化、增强方法，以及能够忽略非必要变异性的新型学习方案，深度学习有望成为临床中广泛适用且可靠的工具。

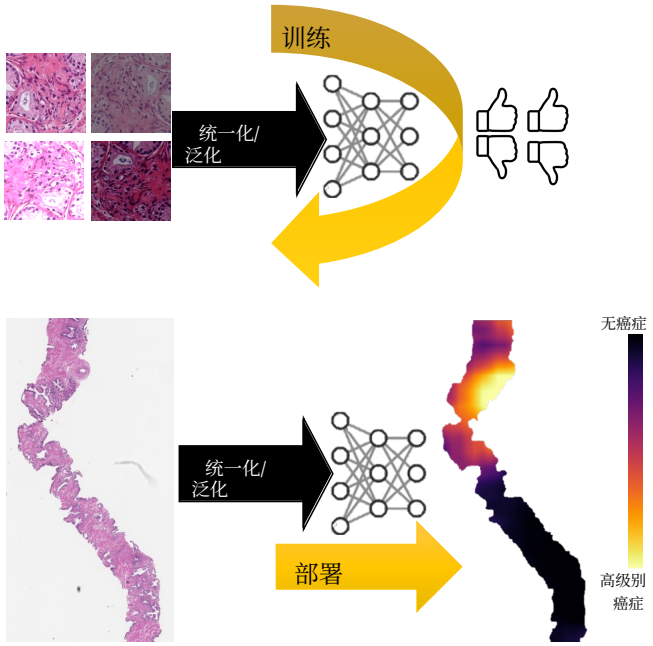


**图 25.1 数字病理学对深度学习的需求**。在数字病理学中，样本间的差异以及标注中的模糊之处，都要求采用能够处理样本统一化和深度学习模型泛化的方法，这些方法可用于训练、推理，或两者兼顾。

## 当前与未来的挑战

将深度学习部署于数字病理学所面临的两大挑战，是可靠训练数据的可用性和样本间变异性。

训练数据也称为“真实值”，这个说法源自遥感领域：数据由安装在卫星或飞机上的成像设备采集，自动化分析的结果（例如道路制图或树种分类）会与通过地面观测获得的“真实情况”进行比较。在数字病理学中，要观测这样的“真实情况”并不简单。通常，“真实值”是由病理学家进行的人工视觉标注。人们常常会问：“基于学习的决策系统需要达到多高的精确度才有实用价值？”这个数值始终必须结合与之比较的“真实值”来回答；由于病理学家在视觉评估上往往存在分歧，因此训练和评估都必须谨慎进行。一种方法是将基于学习的决策系统的自动化结果与多份人工标注进行比较，并以同样的方式将各个人工标注者的结果彼此比较 [4]。 还可以使用其他指标来评估方法性能。患者生存期就是这样一种指标。然而，这项指标的噪声很大，尤其是因为毫米大小的组织样本可能完全无法代表患者的死亡原因。

样本间变异性和泛化性能有限，是将深度学习应用于数字病理学时面临的一个根本问题，而缺乏泛化能力甚至可能引入偏差。例如，数字化组织样本可能采集自多家不同的医院。如果其中一家医院专门诊治某种严重类型的乳腺癌，就存在这样的风险：系统学会将无关的、特定于医院的图像效应与严重乳腺癌联系起来，而不是学习组织形态的实际特征。通常的做法是通过某种形式的数据统一化，使来自不同地点的数据彼此统一，例如通过归一化 [5], ，或者在训练期间通过创建人工数据实现模型的泛化，从而使来自不同地点的样本

涵盖相同的参数空间，参见**图 25.1**。染色归一化最简单的方法是将 RGB图像分离为各个染色成分，并将每个通道缩放到固定的强度区间。更先进的方法，例如稀疏非负矩阵分解，已成功用于对各个染色进行归一化 [6]。

**应对挑战的科学技术进展**

训练深度学习模型时，输入数据会影响模型学习数据相关特征并泛化到新数据的能力。一种标准做法是对训练数据进行颜色和纹理增强，人为生成更多变体供网络学习。然而，通常很难生成一个不偏向任何特定特征的数据集。用于数字病理学的深度学习模型往往会过度拟合训练数据的染色外观。如果模型仅使用来自一家实验室的数据进行训练，通常就无法泛化到其他实验室的数据。

生成对抗网络（GANs）的最新进展能够通过训练模型来模拟观测图像在不同批次或不同地点采集时的外观，从而减少样本变异的影响 [7]。这种基于神经网络的样本统一化方法可以将图像从一种“变异模式”转换为另一种，同时保留组织形态的表型。这样一来，训练数据就能大幅扩充，以覆盖一个特征空间，其中既包含由样本处理造成的非重要变异，也包含需要学习的疾病相关变异。不过，值得注意的是，这一过程可能会引入影响分级的伪结构。

另一种颇具前景的方法是使用所谓的域对抗神经网络，这类网络旨在防止模型偏向于实际上无关的特征，例如图像来源。最终，这类系统能够像人类一样进行调整，因此无需进行归一化或增强；来自不同医院的数据集在前列腺癌分级方面取得的良好结果已表明了这一点 [8]。

新的分子方法有望推动数字病理学中的深度学习超越对含糊不清的人工标注的模仿。近期，新的转录组范围分析技术使研究人员能够直接在组织样本中研究RNA分子，从而保留空间分辨率，并以分子信息补充组织学信息；这些信息对于理解许多生物过程至关重要，也可能与癌症患者的临床管理相关 [9]。将标准临床染色技术与新型分子方法并行应用，可引入一种新型的独立样本标注，用于模型训练，并有望发现以往未曾发现但具有医学意义的组织模式。

**总结**

在多样化的跨国队列中泛化能力有限，是深度学习应用于临床实践的主要障碍之一。从样本采集到染色和扫描，全程严格执行方案并进行质量控制，有望降低变异性。与此同时，能够像人类一样适应偏移域，并学会区分与决策相关和无关图像特征的深度学习方法，正逐渐应用于数字病理学。

由于空间分辨的新型多重靶标特异性分子方法能够与预后和治疗策略直接关联，因此
它们本身就可能成为有用的工具

。不过，它们也可以作为一种手段，对经过标准临床染色剂处理的组织样本平行切片进行分子层面的“标注”，从而为深度学习系统提供输入，使其有望超越对人类观察者能力的模仿。

尽管深度学习要在临床实践中得到广泛应用仍面临诸多挑战，但总体而言，人们的态度较为积极：一项针对来自54个国家的487名执业病理学家的调查 [10]显示，近75%的受访者表示对人工智能作为病理学诊断工具感兴趣或感到振奋。

**致谢**
本研究由欧洲研究委员会通过授予 *C.W.* 的欧洲研究理事会巩固者基金 *CoG 682810*，以及 *SciLifeLab*生物图像信息学设施资助。

**参考文献**
1. E. Bengtsson、H. Danielsen、D. Treanor、M.N. Gurcan、C. MacAulay 和 B. Molnár，“数字病理学中的计算机辅助诊断”，*Cytometry Part A* **91**(6)，551–554，2016年。2. K. Kartasalo、W. Bulten、B. Delahunt、P.-H. Cameron Chen、H. Pinckaers、H. Olsson、X. Ji、N. Mulliqi、H. Samaratunga、T. Tsuzuki、J. Lindberg、M. Rantalainen、C. Wählby、G. Litjens、P. Ruusuvuori、L. Egevad 和 M. Eklund，“活检中前列腺癌的人工智能诊断与格里森分级——当前状态与后续步骤”，*European UrologyFocus* **7**(4)，687–691，2021年。3. W. Bulten、K. Kartasalo、P.-H. Cameron Chen、P. Ström、H. Pinckaers、K. Nagpal、Y. Cai、D.F. Steiner、H. van Boven、R. Vink、C. Hulsbergen-van de Kaa、J. van der Laak、M.B. Amin、A.J. Evans、T. van der Kwast、R. Allan、P.A. Humphrey、H. Grönberg、H. Samaratunga、B. Delahunt、T. Tsuzuki、T. Häkkinen、L. Egevad、M. Demkin、S. Dane、F. Tan、M. Valkonen、G.S. Corrado、L. Peng、C.H. Mermel、P. Ruusuvuori、G. Litjens、M. Eklund 及 PANDA挑战赛联盟，“前列腺癌的格里森分级：PANDA挑战赛”，*Nature Medicine* **28**，154–163，2022年。4. P. Ström、K. Kartasalo、H. Olsson、L. Solorzano、B. Delahunt、D.M. Berney、D.G. Bostwick、A.J. Evans、D.J. Grignon、P.A. Humphrey、K.A. Iczkowski、J.G. Kench、G. Kristiansen、T.H. van der Kwast、K.R.M. Leite、J.K. McKenney、J. Oxley、C-C. Pan、H. Samaratunga、J.R. Srigley、H. Takahashi、T. Tsuzuki、M. Varma、M. Zhou、J. Lindberg、C. Lindskog、P. Ruusuvuori、C. Wählby、H. Grönberg、M. Rantalainen、L. Egevad 和 M. Eklund，“活检中前列腺癌的人工智能诊断与分级：一项基于人群的诊断研究”，*LancetOncology* **21**(2)，222–232，2020年。5. B. E. Bejnordi、G. Litjens、N. Timofeeva、I. Otte-Höller、A. Homeyer、N. Karssemeijer 和 J.A. van der Laak，“全切片组织病理图像的染色特异性标准化”，*IEEETransactions on Medical Imaging* **35**(2)，404–415，2015年。6. A. Vahadane、T. Peng、A. Sethi、S. Albarqouni、L. Wang、M. Baust、K. Steiger、A.M. Schlitter、I. Esposito 和 N. Navab，“保持结构的颜色归一化与组织学图像的稀疏染色分离”，*IEEE Transactions on Medical Imaging* **35**(8)，1962–1971，2016年。7. W.W. Qian、C. Xia、S. Venugopalan、A. Narayanaswamy、M. Dimon、G.W. Ashdown、J. Baum、J. Peng 和 D.M. Ando，“利用生成对抗网络进行批次均衡”，*Bioinformatics* **36**(2)，875–883，2020年。8. I. Arvidsson、N.C. Overgaard、A. Krzyzanowska、F.-E. Marginean、A. Simoulis、A. Bjartell、K. Aström 和 A. Heyden，“用于提升格里森分级分类泛化性能的域对抗神经网络”，SPIE论文集 11320，《Medical Imaging 2020: Digital Pathology》1132016，2020年。

9. M. Mignardi、O. Ishaq、X. Qian 和 C. Wählby，“连接组织学与 Bioinformatics——空间分辨转录组学的计算分析”，*IEEE*学报 **105**(3)，530–541，2017年。10. S. Sarwar、A. Dent、K. Faust、M. Richer、U. Djuric、R. Van Ommeren 和 P. Diamandis，“医师对将人工智能整合进诊断病理学的观点”，*npjDigitital Medicine* **2**(28)，2019年。

# 26 — 使用深度学习对组织学切片进行虚拟染色

Kevin de Haan[1], Yair Rivenson[1], Aydogan Ozcan[1]

1. 加利福尼亚大学洛杉矶分校电气与计算机工程系

## 状态

组织样本的组织化学分析被用作疾病诊断的金标准。这是一项已有百年历史的技术，基于对厚度为 5 至 10 微米、经染色以提供适合人类视觉系统的对比度的组织切片进行显微分析。最常用的染色剂是苏木精和伊红（H&E），此外还有种类繁多的染色剂，可为不同的组织成分提供不同的对比度。染色过程可能耗时且成本高昂，并会产生大量化学废物，其中一些具有毒性。染色过程还会破坏样本，因此通常每个组织切片只能进行一种染色。近期开发了两种不同的基于深度学习的方法，可通过计算生成准确的人工／虚拟染色：1）对无标记组织切片进行虚拟染色；2）将一种染色转换为另一种染色。

无标记组织切片的虚拟染色可完全免去化学染色的需要。该方法利用深度神经网络，通过计算将无标记组织的图像转换为各种染色图像（**图26.1i**）。这项技术采用不同的成像模态作为神经网络的输入，并已开发出多种染色方法。例如，自发荧光显微镜成像[1], 定量相位成像（QPI）[2], 和反射式共聚焦显微镜成像[3] 均已用于对无标记组织进行成像并实现虚拟染色。

染色转换——可替代组织化学染色的第二类方法——利用深度神经网络，将一种化学染色转换为另一种染色[4,5]（**图26.1ii**）。虽然这些方法依赖将化学染色组织的图像作为神经网络的输入，但它们可以减少染色次数，同时不改变现有的临床病理工作流程。此外，许多变换都以苏木精-伊红染色为基础，而这种染色能够稳定地进行，并且已用于几乎所有临床病例。因此，虚拟染色转换技术可用于替代较难实施且成本较高的特殊染色，将其转化为相应的虚拟染色图像。

无标记虚拟染色和染色转换技术均已证明能够生成高度准确的计算染色，其质量与组织化学染色相当，并可用于进行准确诊断[1,4,6]。除了无需进行化学标记（从而降低成本并消除化学废物）之外，这些技术相较于标准组织化学染色还具有多项优势。例如，虚拟染色具有标准化的特点，因为神经网络每次都会执行相同的变换，因此可将染色间变异降至最低。另一个主要优势是，可在同一组织横切面上进行多种染色，使病理学家能够通过多种染色观察同一区域（因此也就是完全相同的细胞），而不必依赖连续组织切片的染色。此外，对未标记组织进行虚拟染色时，组织也会得到保留，以便在将来需要进行更先进的分析（例如分子分析）时使用。

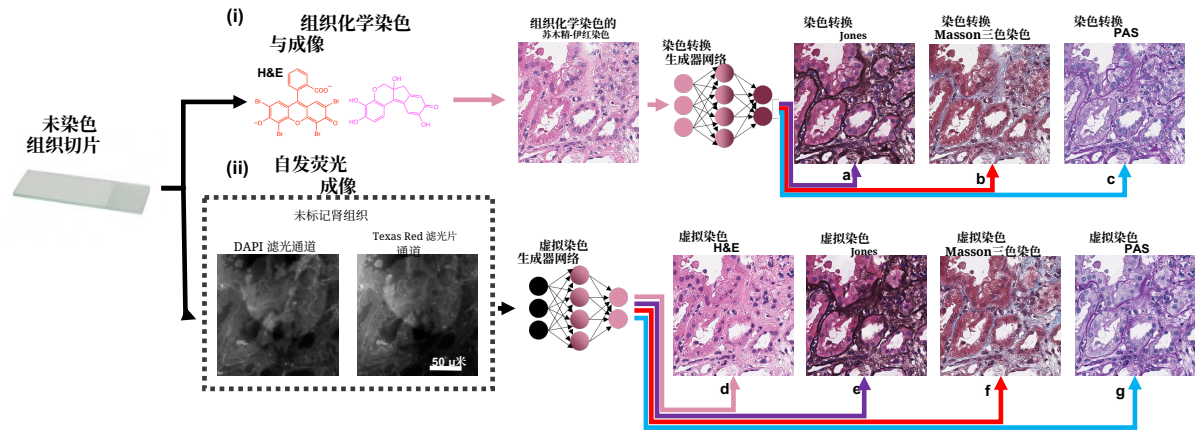


**图26.1 虚拟染色工作流程示例。** 可用于通过计算生成染色组织图像的工作流程示例：（i）将组织化学染色的苏木精-伊红组织图像进行数字化变换，生成其他各种染色图像（此处包括（a）琼斯银染色、（b）Masson三色染色和（c）过碘酸-希夫染色）；或（ii）对组织进行虚拟染色，将未标记组织的自发荧光图像转换为各种染色图像（此处包括（d）苏木精-伊红染色、（e）琼斯银染色、（f）Masson三色染色和（g）过碘酸-希夫染色）。

## 当前与未来的挑战

创建虚拟染色模型所面临的挑战之一，是生成训练神经网络所需的图像数据。这些数据通常需要经过繁复的预处理工作流程，可能耗费大量时间，尤其是在需要进行数据清理等人工步骤时。此外，为了使模型能够推广至新的患者或不同的样本处理流程，还需要从各种来源或实验室收集大量数据。对于染色转换而言，这是一个特别棘手的问题，因为不同实验室之间，甚至同一实验室内部进行的染色都可能存在显著差异。要使这些模型发挥作用，它们必须能够推广至任何给定的（且正确完成的）染色。

图像到图像转换技术（如虚拟染色）通常由采用监督学习训练的深度神经网络执行，利用损失函数直接教会网络建立像素间的映射。这些结构损失函数可确保学习到准确的变换。然而，监督学习技术依赖于对同一组织切片染色前后拍摄的图像进行像素级匹配。这项图像配准任务可能很困难，尤其是在组织于染色过程中受损或发生结构改变时。此外，对于染色转换技术，神经网络的输入是染色组织图像，这使图像配准过程更加复杂，因为组织脱色和重新染色非常困难。尽管已有研究尝试使用无监督学习（例如，使用分布匹配损失）在不同染色之间执行变换，并取得了一些成功[5]，但这种方法可能存在局限，因为仅使用分布匹配损失训练的网络容易产生潜在的幻觉[7]。

## 应对挑战的科学技术进展

这些限制为技术进步留下了空间，使其能够改进以往开发的虚拟染色技术。例如，通过染色风格迁移进行数据增强等技术，能够有效帮助染色转换网络适应大量样本分布 [4]。通过为荧光等其他成像模态开发并采用数据增强技术，虚拟染色技术或许能变得更加有效且可泛化。

通过改进用于匹配标记前后组织图像的多模态图像配准技术，可以显著提升虚拟染色的质量，并简化数据集的开发。合成数据可用于避免图像匹配过程，并已有效用于以监督方式训练染色转换网络[4]。还可以开发更先进的损失函数，降低网络对完美图像配准的依赖。最后，通过改变化学标记过程（即真实值生成步骤），可以优化染色，以减少对组织造成的物理损伤，从而使任何图像配准流程更加准确且易于执行。

除了使用组织化学染色之外，还可进一步拓展计算生成染色所带来的独特机遇。例如，虚拟染色的一项变革性特点是能够通过单次扫描实现多重染色（如**图26.1**所示，其中从单个组织切片的自发荧光图像中生成了四种不同的染色）。当训练单个网络执行多种染色时，还可以将这些染色进行混合，以数字方式生成新的人工染色，从而为不同的组织成分提供不同程度的对比度 [8]。多重染色还可实现微结构化染色，即在一张组织样本图像中，不同的组织区域呈现为不同的染色 [8]。相比之下，组织化学染色是一种破坏性过程，因此每个组织切片只能染色一次，且只能采用一种类型的染色。研究人员可利用由深度学习实现的计算染色的这些及其他独特特性，提高诊断的速度和准确性；进一步的研究则可确定虚拟染色改善现有临床工作流程的最佳应用机会。

此外，利用虚拟染色与图像分析算法之间的协同作用，这项技术还有巨大的发展空间。一些初步研究已开始展现其潜力，例如，有研究表明，染色转换网络提取的信息可用于改进图像分割算法 [9]。这项技术还可用于改进其他下游图像分析，例如自动诊断算法，方法是将虚拟染色整合到基于机器学习的疾病检测工作流程中。

**总结**

对无标记组织进行虚拟染色，以及在不同组织化学染色之间进行染色转换，是一个快速发展的领域，有望显著推动病理学的发展。这些技术能够提高诊断速度，同时降低成本并减少化学废物。尽管这仍是一个新兴的研究领域，但随着技术持续进步并获得监管批准，它将有许多机会辅助人工诊断和计算机辅助诊断。此外，随着病理学领域不断从人工检查玻璃载玻片转向数字化，替代成像模态和数字可视化技术将拥有越来越多的机会发挥作用，并改进标准病理学工作流程。

**致谢**

作者感谢NSF生物光子学项目的支持。

**参考文献**

1. Y. Rivenson、H. Wang、Z. Wei、K. de Haan、Y. Zhang、Y. Wu、H. Günaydın、J. E. Zuckerman、T. Chong、A. E. Sisk、L. M. Westbrook、W. D. Wallace 和 A. Ozcan，“通过深度学习对

未标记组织自发荧光图像进行虚拟组织学染色”，*Nature Biomedical Engineering*2019年。2. Y. Rivenson、T. Liu、Z. Wei、Y. Zhang、K. Haan 和 A. Ozcan，“PhaseStain：使用深度学习对无标记定量相位显微图像进行数字染色”，《光：科学与应用》 **8**(1)，23，2019年。3. J. Li、J. Garfinkel、X. Zhang、D. Wu、Y. Zhang、K. de Haan、H. Wang、T. Liu、B. Bai、Y. Rivenson、G. Rubinstein、P. O. Scumpia 和 A. Ozcan，“使用深度学习对皮肤进行无需活检的体内虚拟组织学”，《光：科学与应用》 **10**(1)，1，2021年。4. K. de Haan、Y. Zhang、J. E. Zuckerman、T. Liu、A. E. Sisk、M. F. P. Diaz、K.-Y. Jen、A. Nobori、S. Liou、S. Zhang、R. Riahi、Y. Rivenson、W. D. Wallace 和 A. Ozcan，“基于深度学习的苏木精-伊红染色组织向特殊染色的变换”，《自然·通讯》（12），4884，2021年。5. J. J. Levy、C. R. Jackson、A. Sriharan、B. C. Christensen 和 L. J. Vaickus，“在中型美国国家癌症研究所癌症中心对深度生成式组织病理图像转换实用性的初步评估”，载于《第13届生物医学工程系统与技术国际联合会议论文集》（BIOSTEC 2020）——第3卷：BIOINFORMATICS，马耳他瓦莱塔，2020年2月24日至26日，2020年，第302–311页。doi：10.5220/0009427603020311。6. Y. Rivenson、K. de Haan、W. D. Wallace 和 A. Ozcan，“利用虚拟染色变革组织病理学的新兴进展”，《生物医学工程前沿》 **2020年**，9647163，2020年。7. J. P. Cohen、M. Luck 和 S. Honari，“分布匹配损失可能在医学图像转换中产生虚假特征”，载于《医学图像计算与计算机辅助干预——MICCAI 2018》，尚，2018年，第529–536页。doi：10.1007/978-3-030-00928-1_60。8. Y. Zhang、K. de Haan、Y. Rivenson、J. Li、A. Delis 和 A. Ozcan，“利用无标记组织的微结构多重虚拟染色进行组织学染色的数字合成”，《光：科学与应用》 **9**(1)，1，2020年。9. A. Kapil、T. Wiestler、S. Lanzmich、A. Silva、K. Steele、M. Rebelatto、G. Schmidt 和 N. Brieu，“DASGAN——用于组织病理学PD-L1图像中上皮区域分析的联合域适应与分割”，2019年7月，访问日期：2020年8月15日。[线上]。可访问：https://openreview.net/forum?id=SkxOZOh2gr

# 27 — 使用虚拟染色进行细胞表型判定

Zofia Korczak[1], Caroline Beck Adiels[1]

1. 瑞典哥德堡大学物理系

## 状态

识别细胞类型并追踪其动态行为，对于阐明生物学机制至关重要。无论是在体外还是体内，细胞—环境相互作用都会引发依赖于刺激的细胞反应。例如，这些反应可能表现为胚胎发生期间的干细胞分化、细胞外环境改变导致的细胞防御反应，或病理状况引起的功能异常。通常，只有在细胞分离后才能获取细胞内基因和蛋白质表达谱，而这会使细胞与环境之间的空间相互作用信息丢失。另一种方法是依据成像捕捉到的视觉特征或细胞形态来判断表型特征。经典方法是使用探针靶向感兴趣的细胞、蛋白质，甚至粒子，再通过显微镜成像进行检测和可视化。探针可以是与特定蛋白质或亚细胞器结合的染料、在基因修饰细胞中表达的融合蛋白，或其他能够提供细胞表型或行为信息的粒子或物质。随后，通过图像处理分析细胞在结构或行为上的差异，并对其进行聚类；通常还会通过额外的生化分析加以确认。空间分辨率和时间分辨率可根据成像设置及所用探针进行调整。有些探针可用于活细胞，并能在有限时间内与活细胞兼容，且影响极小。另一些探针则具有危害，会影响细胞，甚至影响其反应，因此更适合用于已终止的细胞培养物或“死亡”组织。无论如何，该方法的特异性和灵敏度取决于许多不同参数，其中一些参数难以控制。此外，分析显微镜图像中有时细微的变化或差异绝非易事，容易产生误导；尤其是使用僵化、较传统的图像分析工具时，更是如此，更不用说还存在产生偏差的风险。

随着成像技术和人工智能方法的发展，生物筛选进入了一个新时代。深度学习模仿人类的学习过程，并融合了统计学和预测建模。该技术已成功应用于众多生物学领域，例如各种临床诊断（参见参考文献 [2]），单细胞层面信息的定量提取[3], 以及细胞器特异性蛋白质的亚细胞定位[4]。它对于开发无探针细胞识别和追踪分析工具也至关重要。原始输入数据可来自各种显微成像模式：明场[5], 荧光[3], 结构光照明[6], 散射[7], 或相差[1] （参见**图27.1**），以上仅列举数例。上述模型采用监督学习进行训练，这种方法适用于输入和相应输出已知的情况。网络利用带标签的训练数据，逐步形成将输入图像转换为正确输出的策略。另一种方法是采用无监督学习训练模型。无监督学习旨在从未标记数据集中发现隐藏模式。这种方法在模型所考虑的特征方面存在很大的不确定性

虽然至关重要，但与监督学习模型相比，它预计偏差较小，并被视为复杂图像分析软件模型的下一代方案。

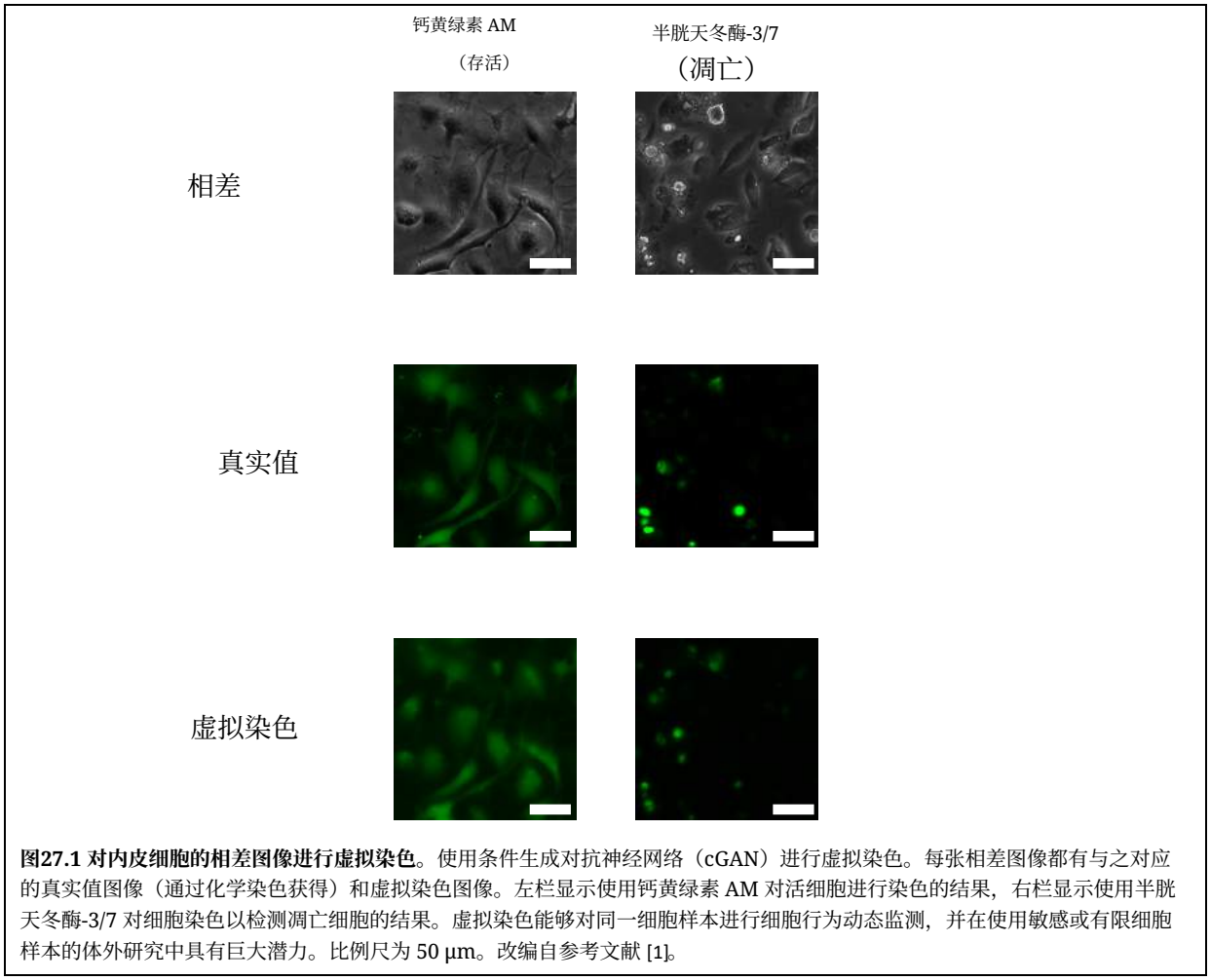


**图27.1 对内皮细胞的相差图像进行虚拟染色**。使用条件生成对抗神经网络（cGAN）进行虚拟染色。每张相差图像都有与之对应的真实值图像（通过化学染色获得）和虚拟染色图像。左栏显示使用钙黄绿素 AM 对活细胞进行染色的结果，右栏显示使用半胱天冬酶-3/7 对细胞染色以检测凋亡细胞的结果。虚拟染色能够对同一细胞样本进行细胞行为动态监测，并在使用敏感或有限细胞样本的体外研究中具有巨大潜力。比例尺为 50 μm。改编自参考文献 [1]。

**当前与未来的挑战**

尽管深度学习在细胞表型分析中用途广泛、应用众多，但要提高该技术在复杂生物环境中的效能，仍有一些挑战需要克服。一方面，需要获取真实值数据；另一方面，需要针对不同目的选择或开发最佳成像模态。

一种基于深度学习的方法成功利用荧光探针生成的真实值数据，根据明场显微图像预测了祖细胞未来的分化方向 [8]。在此例中，若要靶向特定蛋白质，必须先固定细胞培养物，再加入免疫荧光抗体，这使得无法对同一细胞样本进行动态监测。若要获取活细胞数据，则需要使用适用于活细胞的染料、内源性表达的融合蛋白或其他染色方法。这种方法并非总是适用，例如，研究独特的蛋白质表达，或使用难以进行基因操作的细胞时。

下一个难题是在更复杂且更符合生理状态的环境中对细胞进行成像和监测，例如三维细胞培养物。这类体积培养物通常非常致密，并具有复杂的

细胞间相互作用模式，从而导致染色和显微镜成像过程出现问题。首先，靶向特定细胞结构或蛋白质的染料甚至可能无法到达其靶标；在类器官染色中，这种情况很常见，因为染料难以穿透样品。其次，致密的结构会使照明光发生散射，限制分辨率和聚焦效果，从而掩盖读出信号。例如，在采用荧光探测的经典光片显微镜设置中，像差以及由散射造成的低强度照明会限制样品的厚度范围。

另一项相关挑战是同时监测群体层面和亚细胞尺度的动态形态变化。这类信息有助于理解异质性细胞响应与同步细胞响应在细胞通信研究或癌细胞筛选中的重要性。在后一种情况下，有必要根据细胞随时间变化的迁移速度和方向、分化及复制频率来区分细胞行为。

此外，尽管新的模型架构只需少量甚至一张图像即可进行训练，但目前许多表现最佳的网络在训练和数据分析时都需要强大的计算能力。遗憾的是，并非所有有意转用基于人工智能的软件的用户都能使用此类计算集群或配备图形处理器的高性能计算机。

**应对挑战的科学技术进展**

应对这些挑战，需要采用能够提供信息丰富的数据作为深度学习模型输入的成像技术，也需要能够正确解读生物信息实体通常呈现的非网格化排列和相互连接特征的模型（参见**图27.2**）。

多种成像模态的强大成像技术，例如高速光片显微镜[9], 3D结构光照明显微术 [10], 或三维-pRESOLFT（三维、并行化、可逆、可饱和/可切换光学荧光转换）显微术 [11], , 或许能够克服当前体积成像的局限（用于监测具有时间分辨率的动态细胞行为）。例如，三维-pRESOLFT依赖可逆切换荧光蛋白和内源表达标记，已用于监测活神经元受刺激后发生的动态结构改变，同时实现高空间分辨率（低于80纳米）和宽视野（>40 × 40 μm2）。将其与人工智能技术（如图神经网络（GNN））结合，可利用该方法对结果进行分类和预测。图神经网络凭借通过信号处理对非结构化和结构化关系数据进行建模的能力，近年来在生物医学领域尤其受到广泛关注。

图神经网络已被用于一种替代方法：该方法利用光激活荧光探针靶向已标注细胞，并获取活细胞空间转录组学数据 [12]。该方法可并行提供单个细胞的空间结构和高通量基因表达谱，并通过应用图神经网络成功完成聚类。

除了使用昂贵且复杂的显微镜系统进行三维成像外，还可以采用不同的重建方法来增强光场显微镜图像等，从而克服这项技术在非均匀分辨率和重建速度慢方面的局限。通过使用全局体素变换器网络（GVTNs），研究人员能够从未标记的透射显微镜图像中高精度识别亚细胞结构 [13]，；此外，使用一种称为视图-通道-深度（VCD）神经网络的方法，还实现了对光场图像中跳动的斑马鱼心脏进行实时体积重建 [14]

关于不同网络的运行效率，改进网络架构可降低计算速度，并总体减轻本地计算机的计算负载。此外，依赖半监督机器学习网络进行训练也将特别有用：这类网络将少量有标签数据与无标签数据混合使用，在分析大型数据集时尤为适用，而这反过来也意味着所需的计算能力较低。

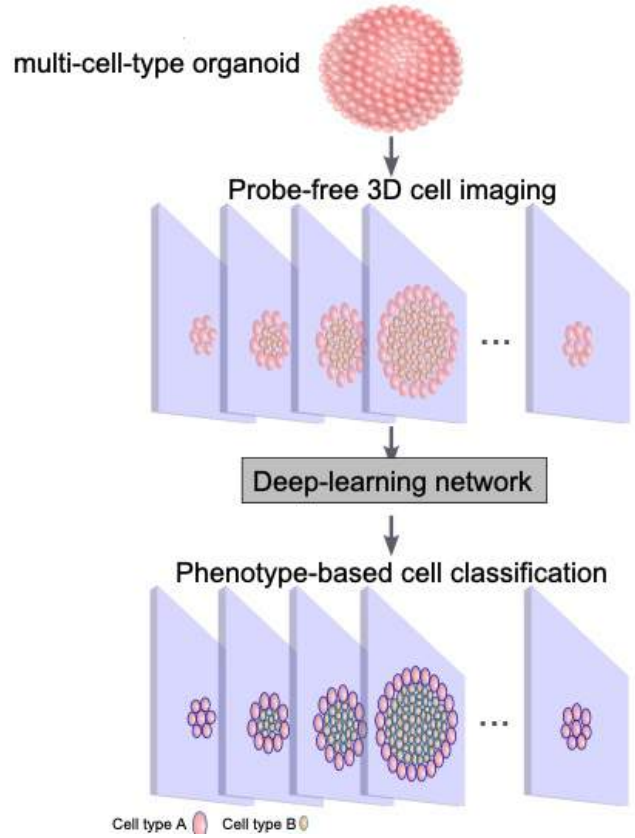


**图27.2 利用三维显微镜成像和深度学习图像分析进行无探针细胞表型分类的方法概述**。类器官是一种三维体外细胞培养物，由器官特异性干细胞衍生细胞构成复杂且自行组装的细胞簇（直径约从几十微米到数毫米不等）。这种培养系统是生物医学研究中的有力工具，尤其是在动态监测时；活细胞三维成像和深度学习表型识别将使其受益。新型成像模态对于实现类器官致密结构的高时间和空间分辨率成像至关重要，而后续的深度学习辅助图像分析有望提取定量的细胞表型信息。

**总结**

细胞生物学与生物医学人工智能是一个快速发展的跨学科领域，需要各学科之间紧密合作。该领域应着力开发新工具，并以便于用户修改和重新训练网络的形式提供这些工具，从而以最少的工作量实现定制图像处理。因此，开发用户友好型软件

界面迫在眉睫。缺少这类界面时，在通常没有编程专家的生物实验室中引入人工智能辅助软件会非常困难。可靠的无探针分析方法必将得到广泛应用，并可能改变许多生物实验室的标准流程。通过将新型成像技术与人工智能相结合，不仅能够区分和分类三维单细胞，还可以预见，复杂的自组装模式——其中多种细胞表型在环境信号的作用下自行组织起来——也将能够随时间进行追踪。

**致谢**

瑞典战略研究基金会（*ITM17-0384*）以及欧盟地平线*2020*研究与创新计划框架下的玛丽·斯克沃多夫斯卡-居里行动项目 *DeLiver*（编号：*766181*）。

**参考文献**

1. Z. Korczak 等，“利用相差成像和深度学习进行动态活细胞/凋亡细胞检测。” *bioRxiv*，2022.2007.2018.500422，2022年。2. A. Esteva 等，“深度学习赋能的医学计算机视觉。” *npj Digital Medicine* **4**，5，2021年。3. S. Helgadottir 等，“利用深度学习从明场细胞图像中提取定量生物学信息。”《生物物理学评论》 **2**，031401，2021年。4. H. Kobayashi、K. C. Cheveralls、M. D. Leonetti、L. A. Royer，“自监督深度学习编码蛋白质亚细胞定位的高分辨率特征。”《自然·方法》 **19**，995–1003，2022年。5. S. K. Sadanandan、P. Ranefall、S. Le Guyader、C. Wählby，“用于细胞分割的深度卷积神经网络自动训练。” *Scientific Reports* **7**，7860，2017年。6. C. Qiao 等，“评估并开发用于光学显微成像中图像超分辨率的深度神经网络。”《自然·方法》 **18**，194–202，2021年。7. B. Midtvedt 等，“利用深度学习增强的离轴全息术快速、准确地表征纳米颗粒。” *ACS Nano* **15**，2240–2250，2021年。8. Y. Zhu 等，“基于深度学习的神经干细胞分化预测性识别。”《自然·通讯》 **12**，2614，2021年。9. K. B. Patel 等，“用于原位采集活体组织体积组织学图像的高速光片显微镜。” *Nature Biomedical Engineering* **6**，569–583，2022年。10. R. Lin、E. T. Kipreos、J. Zhu、C. H. Khang、P. Kner，“通过结构光照明显微术和自适应光学，在多细胞厚样本深处进行亚细胞三维成像。”《自然·通讯》 **12**，3148，2021年。11. A. Bodén 等，“利用三维并行 RESOLFT 显微镜进行体积活细胞成像。” *Nature Biotechnology* **39**，609–618，2021年。12. J. Li、S. Chen、X. Pan、Y. Yuan、H.-B. Shen，“利用图神经网络对空间转录组学数据进行细胞聚类。” *Nature Computational Science* **2**，399–408，2022年。13. Z. Wang、Y. Xie、S. Ji，“用于增强显微成像的全局体素变换器网络。” *NatureMachine Intelligence* **3**，161–171，2021年。14. Z. Wang 等，“利用光场显微镜和深度学习实时重建生物动力学的体积图像。”《自然·方法》 **18**，551–556，2021年。

# 28 — 神经影像分析

Mite Mijalkov[1], Dániel Veréb[1], Yu-Wei Chang[2], Joana B. Pereira[1]

1. 卡罗林斯卡学院临床神经科学系，瑞典斯德哥尔摩 2. 哥德堡大学物理系，瑞典哥德堡

## 现状

磁共振成像（MRI）、计算机断层成像（CT）和正电子发射断层扫描（PET）等神经影像技术已被广泛用于了解健康个体以及患有神经退行性疾病和精神障碍的患者的脑结构和功能。这些技术近期的进步使人们能够采集到数量更多、质量更高的脑影像数据。然而，由于脑解剖结构的复杂度，以及图像本身存在的变异性（例如由不同扫描仪或扫描协议造成），使用传统机器学习方法分析这些数据颇具挑战。因此，亟需开发新颖、高效且可泛化的方法，以处理不断增加的可用数据量 [1]。

深度学习模型是一种很有前景的工具，它利用具有多个层的人工神经网络提取更有意义的信息，从而整合、评估脑影像数据并据此进行预测。尽管这类模型在临床实践中的应用尚不广泛，但已有多个实例展示了其优势 [2,3]，，例如辅助报告：深度学习方法可用于定位或定量分析医学图像中的病理变化，或从脑影像数据中提取更多特征。在神经影像研究中，深度学习工具还被用于图像采集和预处理，以提高图像重建速度 [4]，、根据最初获取的低分辨率图像生成更高分辨率的图像，或检测图像中的伪影 [1,5]。此外，深度学习最重要的应用之一是图像分割，即将图像划分为若干属性相近的区域，以便随后进行定量分析 [6]。最后，深度学习还被用于疾病诊断和预测，根据受试者共有的行为特征或生物标志物，将其划分为不同的疾病组 [2]。

尽管深度学习工具潜力巨大，而且高质量数据日益丰富（这在一定程度上得益于众多大型开放获取数据库的建立），但这些情况表明，深度学习可能会在未来研究中发挥更重要的作用。由于这些工具不依赖于对数据的任何先验假设，深度学习方法能够识别数据中独特的新特征，从而带来新的知识，并有望改变当前已经确立的实践，例如疾病研究或患者分类。一项实例是近期采用深度神经网络架构，分析源自功能性磁共振成像、弥散加权成像或其他成像模态的连接矩阵，以进行图像分类和回归（http://braph.org/ [7]）。

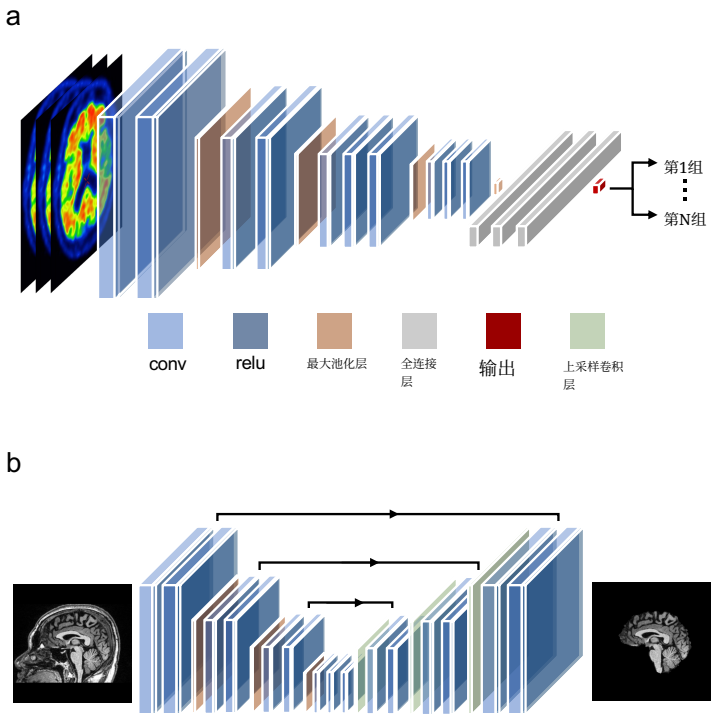


**图28.1. 神经影像学研究中常用深度学习架构示意图。(a)** 用于基于神经影像数据进行准确二进制或多类别分类的典型卷积网络结构。**(b)** 常用于颅骨剥离的 U-Net架构。

## 当前与未来的挑战

尽管在数据分析中使用深度学习方法的益处显而易见，但目前仍有若干局限阻碍其广泛应用。其中一些局限属于技术层面，例如，分析三维或四维医学图像所需的高维方法计算成本高，而且需要大量计算机内存。此外，最终用户若不了解严谨的数学框架和基础理论，可能会难以解释模型，从而限制其应用并导致错误结论 [1]。

深度学习最常遇到的障碍之一，是获取测试和验证模型所需的数据 [5]。这些模型需要大量训练数据，才能实现良好的预测并避免对训练样本过拟合。然而，尤其是在监督学习中，生成标注数据既困难又昂贵 [2]。此外，训练数据需要具有普遍性，并能代表模型预期评估的群体数据。大多数已实施的模型都在本地数据集上进行测试，而这些数据集的分布可能与真实世界数据不同，从而降低特定模型的泛化能力和可复现性，并使其性能难以与其他模型进行比较。最后，即使模型仅应用于某种特定成像模态或疾病，图像质量仍存在差异，例如使用不同硬件或成像方案所造成的差异，这也可能再次降低特定模型的泛化能力 [1,5]。

然而，深度学习模型的主要问题在于缺乏在临床环境中的验证。传统上，模型性能是通过统计指标进行评估的，而这些指标往往是从

合成数据中获得的。人们提出了多种可视化解释方法（例如，遮挡分析、梯度加权类别激活映射），以从深度学习模型中获取热力图，从而进一步理解通过深度学习从神经影像数据中获得的生物标志物表征。然而，在某些情况下，临床专家可能难以解读这类指标，而且它们可能与专家的预测不一致，从而引发对模型预测结果的质疑。此外，研究中的分析通常基于更标准化的高质量图像，甚至是合成数据，而这些数据与临床中从患者身上采集的真实世界数据存在很大差异。因此，这可能成为深度学习模型在临床环境中实现泛化和实际应用的一大障碍 [2,4]。

**应对挑战的科学技术进展**

为克服这些技术挑战，人们提出了多种降低数据维数、进而减轻计算机负载的方法，例如只使用图像的一部分进行训练，或将三维图像表示为一组二维图像，并使用维数较低的模型进行分析。采用迁移学习还可以进一步缩短计算时间[8],这是一种广泛使用的方法，包括先在大型数据集上对模型进行预训练，记录得到的权重，最后将其应用于当前任务对应的神经网络。记录预训练权重后，研究人员只需针对当前任务训练部分层，因此所需数据更少；此外，在大型数据集上进行预训练也能带来更鲁棒的结果。迁移学习的另一项优势，是研究人员能够共享训练充分的深度学习模型，这有助于提升这些模型的泛化能力和鲁棒性。

另一种广泛使用的技术是训练数据增强 [9]，可用于扩充训练集并防止过拟合。采用这种技术，通过在数据中引入一些随机变化，可以有效扩大数据集的尺寸，例如对图像进行随机变换，包括平移、旋转或变形，或引入强度偏移或缩放因子。除了增强之外，人们还开发了其他旨在防止过拟合的技术，包括随机失活（即在训练期间从网络的不同层中随机移除节点），以及对网络进行正则化，即对不同节点施加权重惩罚。

为了提高深度学习方法在临床环境中的应用水平，有必要让最终用户参与模型的设计和测试过程，使用户能够理解模型，并更轻松地解释结果。为此，人们已经采取了一些措施，包括尝试将不同的深度学习框架整合到常用的分析流程和扫描仪本身中 [4]。如果成功整合，这类方法将有助于针对特定方法开展多中心测试和验证，从而提高其泛化能力。

最后，目前有多项研究正在开展，旨在获取并提供大规模的公开可用数据集，例如英国生物样本库 [10], 人类连接组计划 [11] 或 OASIS-3 [12]。这些数据集的可用性对于设计新的深度学习方法极为重要，因为它们能够提供统一的条件，以便对不同方法进行比较和基准测试。

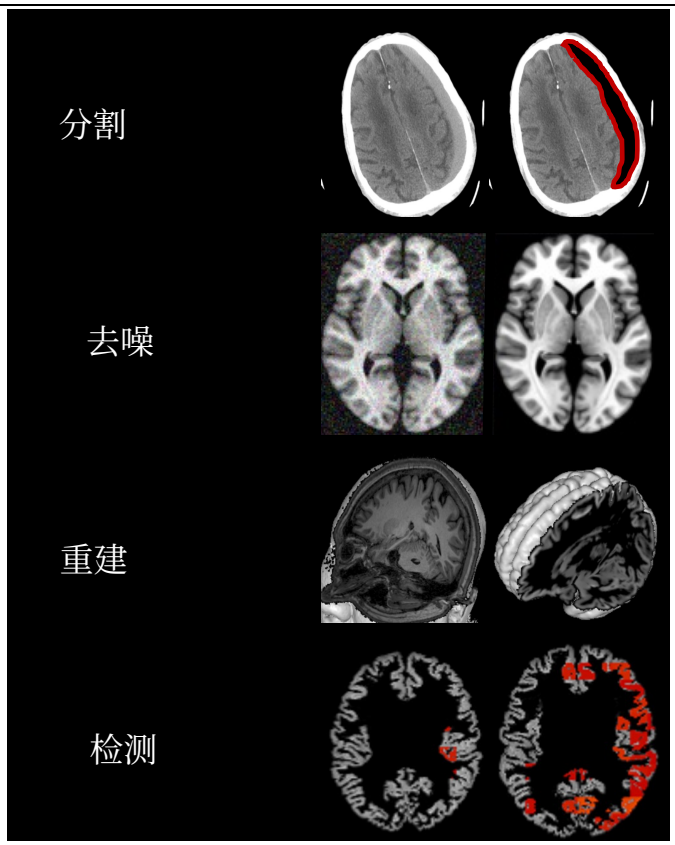


**图28.2。神经影像学流程中深度学习应用的示例**。深度学习能够检测抽象且复杂的模式，因此已广泛应用于神经影像学研究。本图列举了几种常见应用，其中最常见的是分割、去噪、图像或三维重建，以及异常强度模式检测。分割和检测的示例取自作者先前的研究，分别展示了在CT扫描中自动分割硬膜下血肿，以及在PET扫描中识别异常tau蛋白沉积模式。

## 总结

尽管深度学习算法要更广泛地应用于研究和临床实践中的神经影像学分析，仍需克服诸多挑战，但已有大量证据表明，这些算法有望取得极具价值的成果。随着图像采集技术不断进步、人们对模型理论基础的认识不断加深，以及对其应用环境的理解日益充分，我们有理由期待当前的局限性将在不久的将来得到解决。这将使研究人员和临床医生能够就将这些技术应用于临床数据的具体方案达成一致，例如，深度学习算法应作为独立方法来处理特定分析任务，还是应与其他方法或人类专业知识结合使用。因此，未来几年，深度学习在神经影像学中的应用很可能会取得更加令人瞩目的成果。

## 致谢

作者的研究经费由瑞典研究理事会、*Alzheimerfonden*、脑基金会、痴呆症基金会、卡罗林斯卡学院、*Stratneuro*、医学创新中心、*Gamla Tjänarinnor*、*Stohnes*、*Stiftelsen Lars Hiertas Minne*以及卡罗林斯卡医学院老年疾病基金会提供。

## 参考文献

1. A.S. Lundervold 和 A. Lundervold。“聚焦磁共振成像的医学成像深度学习概述。”《医学物理学杂志》 **29**(2), 102–127, 2019年。

2. T. Ching、D. S. Himmelstein、B. K. Beaulieu-Jones、A. A. Kalinin、B. T. Do、G. P. Way、E. Ferrero、P. M. Agapow、M. Zietz、M. M. Hoffman、W. Xie。“深度学习在生物学和医学领域的机遇与障碍。”*Journal of The Royal Society Interface* **15**(141), 20170387, 2018年。3. M. Srikrishna、J. B. Pereira、R. A. Heckemann、G. Volpe、D. van Westen、A. Zettergren、S. Kern、L. Wahlund、E. Westman、I. Skoog 和 M. Schvðll, “基于磁共振成像衍生标签的深度学习可实现人脑CT上的脑组织自动分类”，Neuroimage 244, 118606, 2021年。4. J. Montalt-Tordera、V. Muthurangu、A. Hauptmannand 和 J. A. Steeden。“磁共振成像中的机器学习：图像重建。”*Physica Medica* **83**, 79–87, 2021年。5. M. A. Mazurowski、M. Buda、A. Saha 和 M. R. Bashir。“放射学中的深度学习：概念概述及技术现状调查，重点关注磁共振成像。”*Journal ofmagnetic resonance imaging* **49**(4), 939–954, 2019年。6. Z. Akkus、A. Galimzianova、A. Hoogi、D. L. Rubin 和 B.J. Erickson。“脑磁共振成像分割中的深度学习：现状与未来方向。”*Journal of digital imaging* **30**(4), 449– 459, 2017年。7. M. Mijalkov、E. Kakaei、J. B. Pereira、E. Westman、G. Volpe，以及阿尔茨海默病神经影像学计划，“BRAPH：用于脑连接分析的图论软件”，《公共科学图书馆·综合》12(8), e0178798, 2017年。8. K. Weiss、T. M. Khoshgoftaar 和 D. Wang。“迁移学习综述。”*Journal of Big data***3**(1), 1–40, 2016年。9. C. Shorten 和 T. M. Khoshgoftaar。“深度学习图像数据增强综述。”*Journal of Big data* **6**(1), 1–48, 2019年。10. K. L. Miller、F. Alfaro-Almagro、N. K. Bangerter、D. L. Thomas、E. Yacoub、J. Xu、A. J. Bartsch、S. Jbabdi、S. N. Sotiropoulos、J. L.Andersson 和 L. Griffanti。“英国生物样本库前瞻性流行病学研究中的多模态人群脑成像。”*Nature neuroscience* **19**(11), 1523–1536, 2016年。11. D.C. Van Essen、S. M. Smith、D. M. Barch、T. E. Behrens、E. Yacoub、K. Ugurbil 和 Wu-Minn HCP Consortium。“WU-Minn人类连接组计划：概述。”*NeuroImage* **80**, 62–79, 2013年。12. P. J. LaMontagne、T. L. Benzinger、J. C. Morris、S. Keefe、R. Hornbeck、C. Xiong、E. Grant、Hassenstab, J.、K. Moulder、A. G. Vlassenko 和 M. E. Raichle。“OASIS-3：正常衰老与阿尔茨海默病的纵向神经影像、临床及认知数据集。”*MedRxiv*, 2019年。

# 29 — 生物分析与诊断透射电子显微镜

Damian Matuszewski[1], Gustaf Kylberg[2], Ida-Maria Sintorn[2,3]

1. 信息技术系，乌普萨拉大学，瑞典 2. Vironova AB，瑞典 3. 信息技术系，乌普萨拉大学，瑞典

## 现状

透射电子显微镜（TEM）是唯一能够直接观察和分析纳米尺度生物纳米颗粒及其结构的手段。近年来，人们对基因治疗的关注以及疫苗开发的复兴，使透射电子显微镜作为药物开发和制剂中分析生物纳米颗粒的工具日益受到重视；此外，它在疾病认知和临床诊断中的用途也已得到确立。图像采集自动化能力的出现，加之深度学习带来的期望，为提高透射电子显微镜的普及度带来了可能性与前景。参考文献[1]概述了深度学习在各种电子显微镜应用（包括生物学和材料科学）中的使用。

正如计算机视觉应用以及许多医学和显微镜成像概念验证研究中反复展示的那样，深度学习能够从示例中学习相关信息，这一能力极具潜力。由此，便无需受限于人类向计算机指示应提取哪些信息的能力。其普遍缺点是，除非明确添加，否则先验专业知识以及示例中未呈现的信息不会纳入模型。此外，要弄清并验证模型依据哪些信息作出决策也很困难。这会引发可解释性和可靠性问题，实际上限制了深度学习在现实世界的透射电子显微镜生物加工和临床应用中的部署。这些应用往往面临训练图像数量有限、缺少真实值或真实值不可靠、训练集缺乏代表性或范围过窄，以及监管要求等情况。此外，对于临床情境中的图像数据，人们还担心会遗漏经验丰富的观察者一眼便能发现的“其他”意外信息。

常用的人工智能网络对自己的预测非常自信，即使支持某项判断的证据并不充分也是如此。这会导致所谓的静默失败，即由于训练集过于狭窄而产生错误分类和可靠性不足，也会漏掉样品中未被直接询问的结构。对于某些应用而言，这是不可接受的障碍。不过，在另一些应用中，模型不必极其准确或具备良好的泛化能力也能发挥作用。它们可以解决分析流程中的某个特定步骤，或为该步骤提供助力；用户也可以针对每个待分析的数据集对模型进行交互式微调；模型还可以用于检测或分割，再由用户进一步处理或验证。因此，在许多实际场景中，人们需要的是减少而非消除人工输入的工具。

## 当前与未来的挑战

所有类型的显微镜成像都面临一个共同需求：根据不同成像技术的前提条件和特征，对深度学习方法进行调整和修改。以下是一些需要针对透射电子显微镜领域给予特别关注的普遍问题：

1) **标注图像数据的质量和数量**。必须仔细准备训练数据集，使其能够代表应用场景中可能观察到的所有变化。不过，很容易遗漏罕见但重要的实例。在实际场景中，模型不仅要应对各种数据外观，还要处理训练集中从未出现过的异常。当输入来自与训练集中不同类别或

外观的样品时，典型的监督模型会失效。图1对此进行了说明。对人类专家而言可能显而易见的情况，在训练和验证深度学习模型时却需要仔细考量。

2) **设计与图像及其应用相关的性能与评估标准**。透射电子显微镜是一种复杂的科学仪器，用于获取纳米尺度特征的信息。与许多计算机视觉应用不同，图像是否赏心悦目并不重要，准确性才至关重要。

3) **调整网络架构，使其聚焦于透射电子显微镜的特性**。例如，单像素级别的特征与大尺度信息相结合，通常是研究对象的关键特征。通常无法像许多标准深度学习模型那样，在预处理步骤中对图像进行下采样，否则会造成严重的信息损失。

4) **开发透射电子显微镜专用的数据增强技术**，纳入仪器设置和属性的变化，以及模态特异性伪影。这对于透射电子显微镜等复杂成像技术尤为重要，因为受显微镜数量稀少、成本高昂的限制，很难生成能够体现大量变化（仪器制造商和型号、仪器设置、样品制备等）的真实数据。例如，适当的数据增强在病理学中的染色归一化方面已显示出价值[3]。

5) **降低预期，才能获得真正的价值**。应将重点从试图把深度学习应用并“营销”为解决所有问题的灵丹妙药，转向将其视为工具箱中的一种工具，用来辅助成像和分析流程。例如，如[4]所示，可借此实现仪器控制自动化，简化成像过程并提高鲁棒性；也可以辅助样本分析，从而减少人类专家手动输入更正或验证信息的工作。

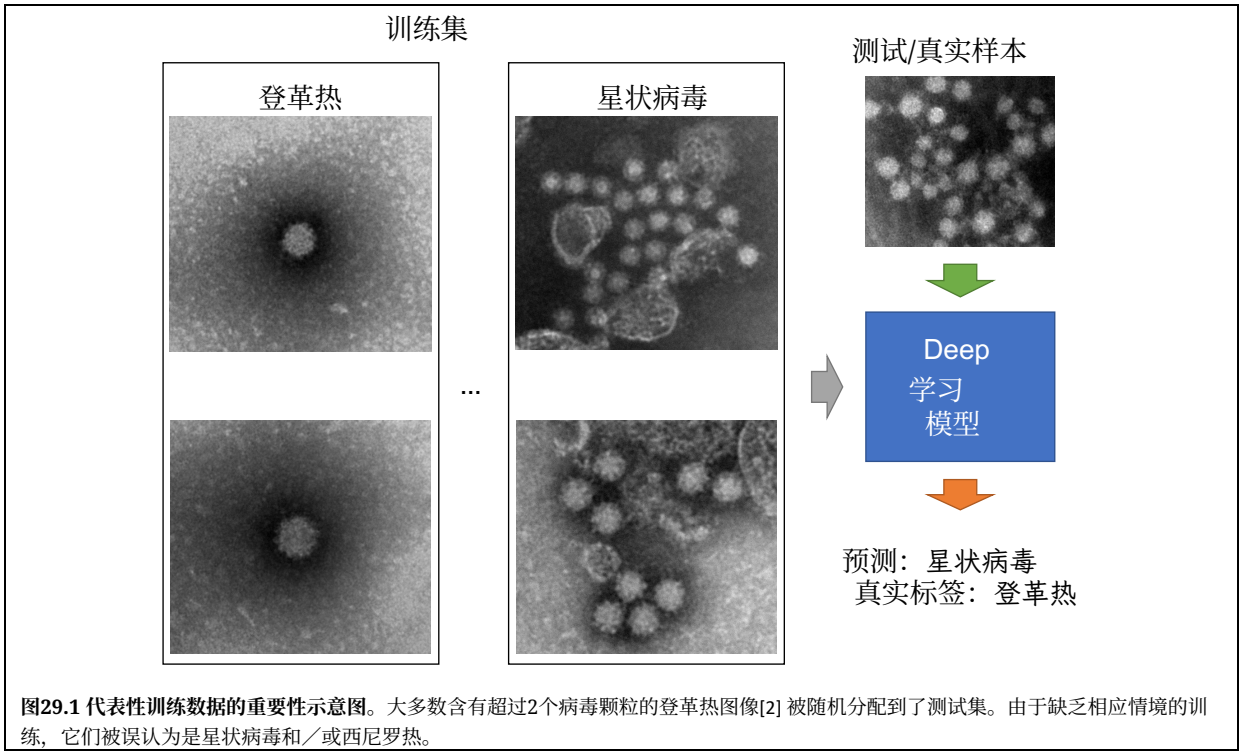


**图29.1 代表性训练数据的重要性示意图**。大多数含有超过2个病毒颗粒的登革热图像[2]被随机分配到了测试集。由于缺乏相应情境的训练，它们被误认为是星状病毒和／或西尼罗热。

**应对挑战的科学技术进展**

如上所述，显微镜成像和医学成像技术面临的许多挑战具有共性和普遍性，但仍需针对特定成像模式或仪器进行研究。因此，深度学习的理论进展，以及从其他成像领域和应用中获得的见解，也

与透射电子显微镜相关。在深度学习模型和/或损失函数中融入物理学和约束条件，是一种已在其他领域证明有效、[5], 但尚未在透射电子显微镜仪器控制和应用中得到广泛探索的技术进展。

另一个例子是人在回路这一趋势 [6], ，即由用户或专家指导模型训练、评估或使用（有时称为人在回路数据分析——HILDA）。这在（已标注）数据有限的应用中尤为有用，或者在每个新样品/数据集都需要微调或人工验证时也很有帮助。在电子显微镜数据中展示的一个此类人在回路方法示例是 [7]。用户通过交互方式标记要在数据集中搜索的对象类型，然后在迭代步骤中验证建议的对象。

训练数据和电子显微镜基准数据集的缺乏，在一定程度上正通过竞赛或“挑战赛”得到解决，例如 ISBI 2021 挑战赛“基于电子显微镜图像的大规模线粒体三维实例分割”，以及 2012年挑战赛“电子显微镜图像堆栈中的神经元结构分割”。此外，期刊和会议近期提出的公开共享图像数据的要求，自然会促使透射电子显微镜图像的可用性也随之提高。近期，作者 Matuszewski 和 Sintorn 发布了一个病毒分类数据集和深度学习基准性能研究 [2], ，重点讨论训练集和测试集的代表性及其对现实应用中性能和可靠性的影响。

近年来，随着人们对理解深度学习决策的兴趣日益浓厚，研究者更加关注如何设计能够生成置信度分数的模型[8], 、异常检测器[9], 以及可解释模型，以增强深度学习的可靠性和可信度。沿着这一方向，深度学习在医学成像领域技术日趋成熟的一个标志，是将深度学习应用于更小、更易解释的组成部分（可将其视为工具箱中的一种工具），通过提供额外信息来辅助决策，而不是构建一个包罗万象的深度学习黑箱解决方案[10]。

**总结**

深度学习在实际场景中部署所面临的许多问题，在各种成像模态中都很常见，例如缺乏数量充足、类型多样且贴近实际并经过标注的训练数据，以及结果的可靠性和可解释性。深度学习方法的普遍进步，以及更多透射电子显微镜图像数据的公开，当然也将惠及透射电子显微镜领域的用户。此外，将电子成像物理学和仪器特性纳入深度学习模型和数据增强中，是其他成像领域可预见的一种适应性调整。

或许更具体地针对透射电子显微镜，我们预见深度学习将在仪器控制和自动化中发挥重要作用，从而让这项复杂的成像技术更易于使用、更易于普及。我们还认为，着眼于透射电子显微镜前提条件的深度学习理论研究，将推动开发更优、更高效的架构，以处理透射电子显微镜成像与分析中涉及的大规模数据。要获得洞见，往往需要理解多个尺度上图像特征之间的相互作用与相关性，包括最精细像素级的信息；而在样品构成的巨大搜索空间中寻找对象或感兴趣区域，则需要遍历多个尺度。

**致谢**

这项工作获得了瑞典电子科学合作组织（*eSSENCE*）提供给作者 *DM* 的博士后资助。作者 *IS* 获得了乌普萨拉大学 *AI4Research* 倡议以及瑞典战略研究基金会的支持（资助编号 *BD150008*）。

**参考文献**

1. K. P. Treder, C. Huang, J. S. Kim, A. I. Kirkland，《深度学习在电子显微镜中的应用》，Microscopy 71，i100–i115，2022年。2. D. J. Matuszewski, I. Sintorn。《TEM 病毒图像：基准数据集与深度学习分类》。生物医学中的计算机方法与程序 209，106318，2021年。3. D. Tellez, G. Litjens, P. Bándi, W. Bulten, J.-M. Bokhorst, F. Ciompi, J. van der Laak,《量化数据增强和染色颜色归一化对计算病理学卷积神经网络的影响》。医学图像分析 58，101544，2019年。4. E. Rotunno, A.H. Tavabi, P. Rosi, S. Frabboni, P. Tiemeijer, R.E. Dunin-Borkowski, V. Grill，《使用卷积神经网络对电子光学束整形元件进行校准》，arXiv:2101.04358 [physics.ins-det], 2021。5. J. Willard, X. Jia, S. Xu, M. Steinbach, V. Kumar，《将基于物理的建模与机器学习相结合：综述》，arXiv:2003.04919v2 [physics.comp-ph], 2020。6. S. Budd, E. C. Robinson, B. Kainz。《医学图像分析中的主动学习与人在回路中的深度学习综述》，医学图像分析 71，102062，2021年。7. A. Gupta, C. Wählby, A. Sabirsch, I. Sintorn，《SimSearch：用于快速检测显微图像中感兴趣区域的人在回路中的学习框架》，arXiv，2022年。8. M. Abdar, F. Pourpanah, S. Hussain, D. Rezazadegan, L. Liu, M. Ghavamzadeh, P. Fieguth, X. Cao, A. Khosravi, U.R. Acharya, V. Makarenkov，《深度学习中的不确定性量化综述：技术、应用与挑战》。信息融合 76，243–297，2021年。9. G. Pang, C. Shen, L. Cao, A. V. D. Hengel，《异常检测的深度学习：综述》。ACM 计算调查（CSUR）54(2)，1–38，2021年。10. C. Rudin，《停止为高风险决策解释黑箱机器学习模型，改用可解释模型》。Nature Machine Intelligence 1(5)，206–215，2019年。

# 30 — 高内涵高通量筛选

Juan C. Caicedo[1], Beth A Cimini[1]

1. 麻省理工学院与哈佛大学博德研究所，波士顿（马萨诸塞州），美国

## 状态

借助现代光学、电子和化学技术，成像实验可以高效地以高通量开展，以应对药物发现和功能基因组学中的紧迫研究问题。鉴于此类实验会产生海量成像数据，还需要准确的软件平台，将图像转化为高内涵定量数据，以支持后续研究。表型高内涵成像分析已用于确定药物的作用机制、预测毒性，甚至预测其他非成像分析的结果（参见文献[1]）。尽管深度学习方法目前尚未普遍应用于高内涵/高通量筛选（HCS/HTS），近年来的研究已展示出深度学习为这些分析带来价值的多种方式（**图30.1**）。

将图像转化为生物学洞见的计算工作流程通常从分割 — 开始，也就是为图像中的每个目标对象精确划定边界。近年来，这一领域进展最为显著，这得益于能够在不同成像实验中泛化的模型[2]，，以及已广泛提供给研究群体使用的有效工具[3]。

当感兴趣对象——通常是单细胞——通过分割被识别出来后，下一个挑战就是特征提取。这包括使用多维表征 [4]，对图像中观察到的细胞状态、细胞结构和表型的独特属性进行量化。表征学习的最新进展可能会自动实现特征表征的数据驱动优化，而不再要求分析人员手动创建特征集。

如今，可以利用图像生成和修改策略来增强和扩展图像本身的质量与内容。生成模型（例如部署于参考文献 [5] 中的一些模型）现已能够提高图像的分辨率和信噪比，从而改善所获得的定量数据。类似地，网络可以根据未染色图像预测许多生物染料的染色模式，使研究人员能够生成从未被直接染色的生物结构的测量结果（综述见参考文献 [4]）。生成模型还可以通过对技术变异（例如孔效应或板效应）进行建模并随后将其移除，来减小这些变异的影响；这使研究人员能够计算出某个观察到的图像在不同批次 [6] 中采集时的样貌。

最后，深度学习有望改变分析所需的运行规模：利用正交分析已收集的数据训练模型，以预测另一项分析的结果，已被证明可将二次筛选的命中率提高至原来的 200 倍 [7]。

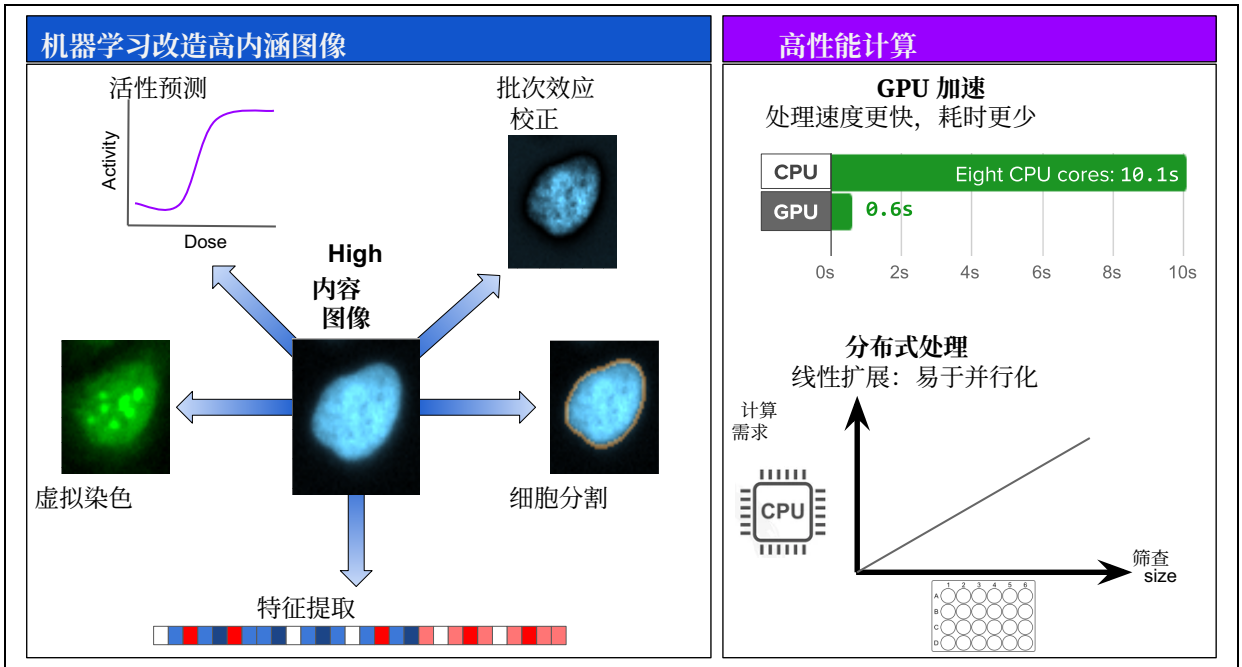


**图 30.1. 用于高内涵、高通量分析的深度学习。**左图：深度学习可为高内涵检测带来价值的五种方式。按顺时针方向从左上方开始：预测其他非成像分析的结果；去除图像中的模糊、噪声或批次引起的变化；分割对象；提取数值特征数据；以及预测未采集的染色图像。这些方法并非互斥——可将其中任意一种或多种用于任何高内涵分析。细胞核图像由 Broad Bioimage Benchmark Collection BBBC022 提供。右图：处理成像筛选需要高性能计算。深度学习模型通常受益于图形处理器（GPU）加速（上）。处理高内涵筛选/高通量筛选数据时，可在模型训练和部署期间将处理负载分配给多台机器；随着图像数量增加，计算需求呈线性扩展。与数据量增加时计算需求呈指数增长的其他应用相比，这种情况更为有利（下）。请注意，无论是购买硬件还是使用云服务，GPU 加速都比 CPU 计算昂贵得多。

## 当前与未来的挑战

随着近期生物图像深度学习研究的进展，问题已从评估深度学习是否有所助益，转变为选择工作流程中哪些环节最能受益于深度学习。由于深度学习有望改善高通量筛选/高内涵筛选流程的许多环节（见上文），因此在每个步骤中，都必须评估有哪些可用方案、这些方案能在多大程度上改善最终数据，以及实施它们所需的计算资源、人员投入和机会成本。

计算方面的考量对高通量筛选/高内涵筛选至关重要：分析通常涉及数十或数百块微孔板，每块板有数千个视野 [1]。在这种规模下，速度至关重要：每增加一秒的分析时间，每块板就相当于增加 ~1 CPU 小时。虽然深度学习技术的速度可能比传统方法快几个数量级 [8]，但这种速度提升往往依赖于使用图形处理器，而与中央处理器相比，在大多数本地部署和云环境中，图形处理器都更为稀缺。

人员与机会成本更难预测或衡量，因为要评估潜在收益，就必须先调查各种选择（因此也会部分承担这些成本）。对于已有工具可用于“实质上相似”任务的情况，必须谨慎评估外部训练数据与自身数据有多相似；肉眼无法察觉的差异仍可能意味着需要重新训练。如果外部训练数据足够庞大且多样，公开可用模型或许无需进一步训练即可适用；如果开发者已发布其在公开基准上的性能统计数据，通常更容易做出这项评估。即便现有工具无需重新训练，许多工具在使用和／或扩展时仍需要高阶计算技能；近期一项关于“进入高内涵筛选领域的障碍”的会议调查指出，“获取知识”是最大的障碍，而受访者最希望新员工掌握的技能是“Python”（Cimini，准备中）。

如果认定没有合适的现有工具，就会出现更多需要做出的决定——是改造现有的生物成像工具，还是寻找新的计算架构？如果使用现有工具，是从头开始训练，还是微调现有模型？是否有可用于训练的现有生物数据集，还是必须自行生成？应如何定义真实值，如何高效地生成真实值，以及哪些指标适合用于衡量成功？这些问题即便对专家而言也很难回答，对新用户来说则更是如此。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习在自然图像领域取得成功，部分归功于经过精心整理、带有真实标注的数据集。显微镜图像分析任务的真实值采集进展较慢，但该领域在细胞分割等问题上正不断取得进展[2,3]；要在不同实验条件下扩充可用于训练可复用模型的高质量标注数据，仍需开展更协调一致的工作。由于创建此类数据集成本高、耗时长，因此应深入探索无需监督或显式标注即可进行学习的训练策略。例如，一类自监督学习技术（包括对比学习）利用不同变换（如裁剪或颜色调整）下的图像匹配，提取对机器有用（尽管人类难以理解）的特征，从而体现图像的独特性。事实证明，这些特征对于识别自然图像中的对象极具信息价值；它们也可用于细胞图像的表型分析，或通过显著减少微调所需的真实值，加快分割和／或分类模型的训练。

虽然需要更强大的网络，但如果用户觉得这些工具太难使用，它们就无法得到广泛采用。要让最终借助这些工具推动生物学发现的科学家能够使用它们，就需要为非专业人士提供教育材料、教程、指南和文档，介绍如何做出决策（例如选择模型、设置超参数等）并在实践中使用这些工具。这就需要开发易于使用的用户界面 [9] 或即插即用的 API 库，可加载到 Jupyter Notebook [5] 或类似环境中，以支持快速且可复用的处理流水线的开发。

最后，科学家确定某种方法后，深度学习架构需要大量计算资源；虽然训练阶段的需求最大，但在推理模式下处理新数据集也可能需要大量资源，这对高通量筛选的规模而言尤其具有挑战性。必须开发并采用模型压缩和高效架构方面的新进展，以用于生物图像分析。节能架构可以在移动设备上运行，在有图形处理器的地方可用于加速处理，也可部署在没有图形处理器的地方。为了处理高通量筛选规模的数据，还必须开发工具，以便更轻松地在远程服务器或云计算服务 [5,9,10]之间并行化模型。社区还需要相关指南，帮助人们选择合适的计算方案，并在实践中做出架构和平台选择。

**总结**

尽管目前仍处于早期阶段，深度学习有望彻底革新整个高内涵筛选/高通量筛选流程，从测定设计、化合物筛选，到分割和特征提取。随着用于应对这些以及其他尚未设想可能性的全新工具不断被创建和/或完善，我们相信，强调可重用性、可解释性，以及可扩展性将有助于整个社区。在多样化图像集上进行训练虽然更加耗时，但能够形成可重用的工具，只需极少的手动配置；[3], 而全面的文档则能提高实际重用能力。工具应最大限度地提升可解释性：对于某些工具，这可能意味着披露失效模式；对于

另一些工具，这可能意味着添加注意力图，以便用户了解促使网络得出特定结论的依据；而对于其他工具，则可能需要创建真实值基准，以便更好地统一不同实验中的结果。最后，必须开发可重用且易于操作的方法，以便对新方法进行通用扩展，从而确保其达到高通量筛选规模并得到采用。如果能够创建此类工具，并以广泛可用且用户友好的方式提供，那么不难想象，再过短短几年，高内涵筛选/高通量筛选中将不会有任何步骤不例行采用深度学习模型。

**致谢**

本研究获得了 *Broad*研究所向 *JCC* 提供的施密特奖学金计划资助、美国国家科学基金会向 *JCC* 提供的编号为 *2134695* 的资助，以及美国国立卫生研究院向 *BAC* 提供的编号为 *P41 GM135019* 的资助。本项目部分得以实现，得益于陈-扎克伯格倡议捐赠者建议基金向 *BAC* 提供的编号为 *2020-225720* 的资助；该基金由硅谷社区基金会管理。

**参考文献**

1. S. N. Chandrasekaran, H. Ceulemans, J. D. Boyd, 和 A. E. Carpenter，“基于图像的药物发现表型分析：是否该进行机器学习升级了？”，《自然综述：药物发现》 20(2), 145–159, 2021年。2. J. C. Caicedo 等，“跨成像实验的细胞核分割：2018年数据科学竞赛”，《自然·方法》，**16**(12), 1247–1253, 2019年。3. C. Stringer, T. Wang, M. Michaelos, 和 M. Pachitariu，“Cellpose：用于细胞分割的通用算法”，《自然·方法》 **18**(1), 100–106, 2021年。4. A. Pratapa, M. Doron, 和 J. C. Caicedo，“基于图像的深度学习细胞表型分析”，《化学生物学最新观点》**65**, 9–17, 2021年。5. L. von Chamier 等，“借助 ZeroCostDL4Mic 推动显微镜成像深度学习普及”，《自然·通讯》 **12**(1), 2276, 2021年。6. W. W. Qian 等，“利用生成对抗网络进行批次均衡”，Bioinformatics **36**, i875–i883, 2020年。7. J. Simm 等，“重新利用高通量图像检测，实现药物发现中的生物活性预测”，《细胞化学生物学》 **25**(5), 611–618.e3, 2018年。8. J. C. Caicedo, C. McQuin, A. Goodman, S. Singh, 和 A. E. Carpenter，“单细胞特征嵌入的弱监督学习”，《*IEEE*会刊计算机视觉与模式识别会议论文集》**2018年**, 9309–9318, 2018年。9. M. S. Davidson 等，“利用卷积神经网络从细胞学涂片中自动检测疟原虫并判定其阶段”，《生物成像》 **1**, e2, 2021年。10. C. McQuin 等，“CellProfiler 3.0：面向生物学的新一代图像处理”，《公共科学图书馆·生物学》**16**(7), p. e2005970, 2018年。

# 31 — 超声与光声图像形成

Muyinatu A. Lediju Bell[1]

1. 约翰·霍普金斯大学，美国

## 状态

诊断和介入医疗程序的成功，深深植根于现代成像系统提供清晰且易于解读信息的能力。全球各地医院和诊所中最普及的成像系统之一是超声成像系统。经过60+ 年的发展，超声成像相较于其他医学成像和显微成像系统，具有四大优势：(1) 安全，(2) 便携，(3) 成本效益高，以及 (4) 实时提供图像。

超声成像系统通过传输和接收声波进行成像；而在加入激光和其他光源、构成光声成像系统后，则是传输光并接收声波。这种替代方法能够提供光吸收信息，而非传统超声成像系统所提供的声反射信息，同时保留上述四大优势。超声图像和光声图像还可以交错呈现，以提升整体临床体验。

在超声与光声成像系统中，声学传感器阵列接收到的声音通常会通过波束形成过程转换为可解读的图像；波束形成过程往往是软件防范图像质量不佳的第一道防线。然而，传统波束形成过程长期以来一直受到反复出现的局限性影响，导致部分患者的图像质量不佳。具体而言，传统波束形成方法依赖于对波传播的假设（例如声速、声传播路径），但在患者间和患者内存在显著差异时，这些假设并不成立。例如，人们通常假设从超声或光声源到声学接收器之间存在一条单一的直接路径，但这一假设没有考虑声阻抗差异存在时发生的多路径声散射或反射。

人们已采用先进技术来改进波束形成器、图像质量和诊断可解释性，但迄今没有哪项进展能在单个图像形成或信号处理步骤中兼具多种优势 [1]。因此，利用同一份原始数据所能提供的潜在有用信息，要么无法获得，要么需要耗费较长时间才能获取；这是因为先进方法的实现可能耗时，而且通常按顺序而非并行方式应用。深度学习方法的优势在于能够从多个训练样本中学习，而不是依赖有缺陷的假设。这一优势为生成清晰、可解释的图像打开了大门：只需输入一份原始传感器数据，即可并行整合多种优势 [1]。**图31.1**展示了这种方法的一个示例。

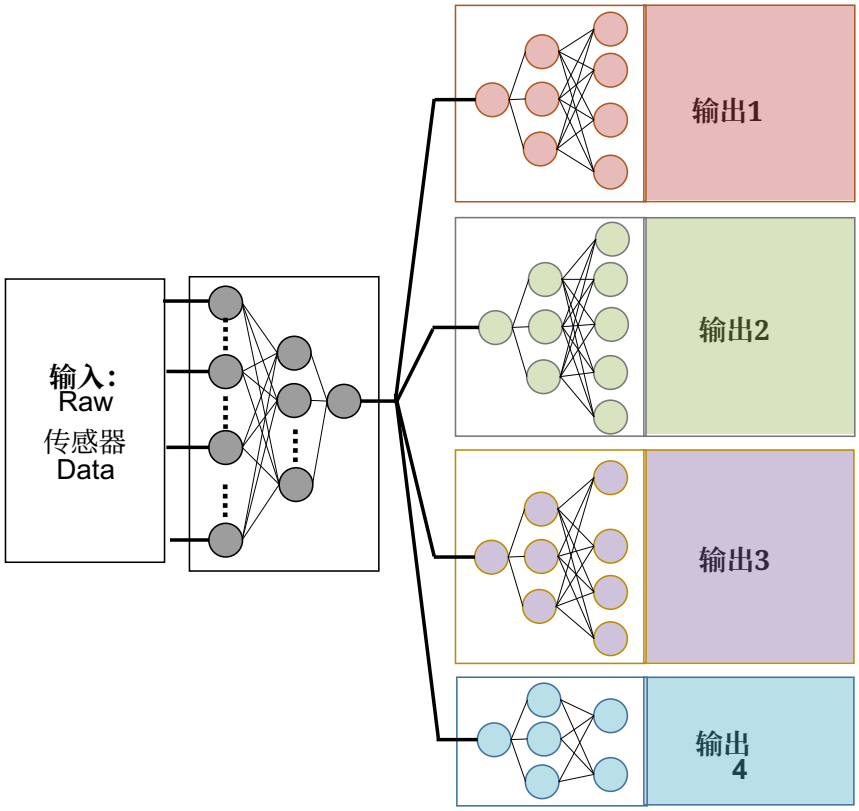


**图31.1 深　　度学习增强的超声成像**。提供单个原始超声传感器数据输入的总体概念，由此产生多输出，并在深度神经网络（深度神经网络）的辅助下同时并行生成。

**当前与未来的挑战**

深度学习能否在单个步骤中结合多种图像形成和信号处理技术，生成超声和光声图像，面临三项重大挑战。首先，必须在存在噪声和伪影的情况下定位并检测超声和光声源。根据惠更斯-菲涅耳原理 [2]，，这一挑战可简化为检测点状源；这些点状源可以是组织中的单个散射体、针尖或导管尖端、来自光纤尖端的光声信号，也可以是单个微气泡。当点源产生的声学响应从声源向外传播至换能器时，记录到的波前形状取决于声源与声学接收器之间的距离。因此，距离声学接收器阵列较近的声源，其记录到的波前形状会与距离较远的声源不同。深度神经网络（DNN）能够学习这种独特的形状与深度之间的关系 [3,4]。与受波束形成过程所施加的衍射极限约束而生成的图像相比，这种方法的优势包括能够以更高的精确度和准确性对声源进行空间定位 [4,5]。

第二个挑战是准确分割感兴趣的成像目标或疾病特征。其根本目标是生成一幅突出特定应用所关注结构、弱化周围结构的图像。分割通常在图像形成后进行，但如果图像质量较差，分割效果也会受到影响。当经验不足的用户操作超声或光声成像系统，或自动化任务依赖分割结果来提供诊断、治疗或医学评估时，这一问题尤为突出。

第三个挑战是使用先进的波束形成方法（例如基于相干性的图像）生成图像所需的时间。例如，在传统杂波抑制方法（如谐波成像）失效的情况下，短滞后空间相干性（SLSC）[6]波束形成器能够有效抑制声学杂波。SLSC波束形成还能够确定可疑肿块中的液体或固体成分[7]。尽管具有这些优势，SLSC及类似的先进波束形成器在实现时仍可能需要大量计算，这阻碍了它们集成到现有临床系统中。

要实现未来广泛影响，还必须克服其他挑战，包括理解、解释和预测预期网络结果及故障点的能力。这种能力将推动新型深度学习方法的系统化开发。此外，为先进波束形成方法实现最优加速，将拓展现有潜力；与机器人方法进行智能集成，则将推动全自动化操作的未来发展。

**应对挑战的科学技术进展**

深度神经网络被应用或创建，用于应对上述三个重大挑战。多个网络展示了点源检测能力，包括 AlexNet、Resnet 和 VGG-16[5]。U-Net [1]展示了从原始数据中进行分割和特征检测的能力。CohereNet [8] 被创建出来，用于计算先进 SLSC 波束形成器所需的相干函数。CystNet1 [9,10] 和 CystNet2 [10] 各由一个编码器和两个解码器组成，这些网络旨在并行地对原始超声数据中的囊肿进行成像和分割，而非采用传统的顺序方法。图2展示了其中部分深度神经网络的架构。

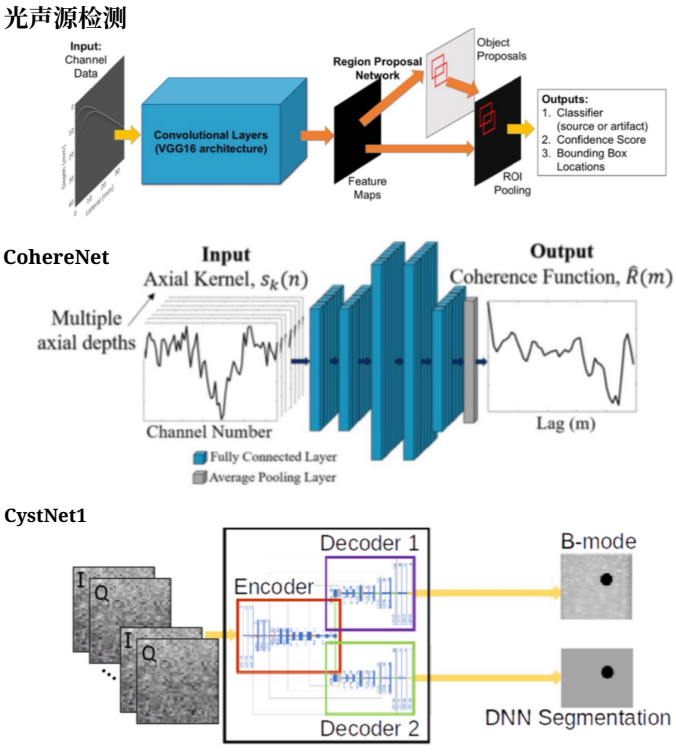


**图31.2 应用于光声成像和超声成像的神经网络示例**。深度神经网络架构被应用或创建，用于应对光声源检测、空间相关性计算和分割方面的挑战。每个深度神经网络都接收不同形式的原始通道数据。改编自参考文献 [4,8,10]。

这些进展分别或共同证明了利用深度神经网络从单个原始通道数据输入中生成多个输出的可行性。之所以说是共同证明，是因为可以将多个深度神经网络并行串联，从而使原始数据能够输入每个串联的网络，并由每个输入同时产生多个输出。尽管上述许多网络采用模拟波传播物理过程的数据[5,9,10] 或体内乳腺数据进行训练，后者包含高度异质的乳腺组织所带来的变异性[8]，，但每个深度神经网络都能处理相对于训练数据具有足够变异性的数据源，这是一项关键进展。这种泛化能力凸显了训练过程的成功。

在应对现有挑战而采用的科学与技术所直接促成的成果中，提供人类可解释图像与融合机器人技术的最新进展之间，似乎也出现了一种取舍。例如，可以创建深度神经网络（DNN）来完成特定任务，以便集成到机器人系统中，例如通过实现视觉伺服来寻找目标对象并使其保持在画面中央。该 DNN 的输出可以是坐标，而不是再从人类可解释图像中提取坐标 [11]。另一方面，人类可解释图像有助于监督自动化流程、在必要时进行干预，并在发生运行时错误时提供可解释的报告。因此，机器人与人类数据格式化这两种看似相互竞争的方法，在并行运行时各有优势，能够相辅相成 [9]。

预计资源的可用性将进一步推动该领域的发展，尤其是通过开源实现降低进入这一原本高度专业化领域的门槛。其中一项资源得益于深度学习超声波束形成挑战赛而得以实现 [12,13]。该挑战赛的成果包括免费提供的数据集、代码和训练后的网络权重，这些资源可结合使用，为新方法建立基准。

**总结**

超声与光声成像是两种使用相同传感硬件生成图像的技术。超声与光声成像系统接收到原始传感器数据后，可通过多个信号处理和波束形成步骤，应对涉及多种器官、诊断和操作的各种医疗保健挑战。深度学习为并行实施多种方法提供了可行途径，甚至可能将这些方法整合到单个信号处理步骤中。这一途径有望突破以往的障碍，为所有患者生成高质量图像。

**致谢**

感谢 *Photoacoustic and Ultrasonic Systems Engineering (PULSE)* 实验室历届及现任研究人员和临床合作伙伴对这一研究方向的贡献，也感谢所有 *CUBDL* 联合组织者和数据贡献者，正是他们帮助我们提供了这些开源资源。本研究部分由 *NIH Trailblazer Award*（资助编号：*R21-EB025621*）、*NIH Trailblazer Award Supplement*（资助编号：*R21-EB025621-03S*）、*NSF CAREER Award*（资助编号：*ECCS 1751522*）、*NSF SCH Award*（资助编号：*NSF IIS-2014088*）、计算感知与医疗机器人本科生研究体验计划（资助编号：*NSF EEC 1852155*）以及 *NIH R01-EB032960* 资助。更多信息请访问 *https://pulselab.jhu.edu* 和 *https://cubdl.jhu.edu*。

**参考文献**

1. Bell MAL，“深度学习时代的超声成像应用”，*SPIE*光学系统会议论文集 + 光子学，圣迭戈，加利福尼亚州，8月21日-25, 2022 [特邀报告]2. H. G. Kraus，《美国光学学会杂志 *A*》 **6**，1196，1989年。3. Reiter A 和 Bell MAL，“一种用于检测光声数据中点源的机器学习方法”，SPIE西部光子学展论文集，旧金山，加利福尼亚州，2017年1月28日至2月2日。4. Allman D、Reiter A、Bell MAL，“利用深度学习实现光声源检测和反射伪影去除”，*IEEE Transactions on Medical Imaging* **37**(6)，1464–1477，2018年。5. Bell MAL，“以深度学习解读光之声，引导手术”，*SPIE*西部光子学展论文集，旧金山，加利福尼亚州，2019年2月2日至7日。6. Lediju MA、Trahey GE、Byram BC、Dahl JJ。“背向散射回波的空间相干性：成像特征”，《*IEEE*超声、铁电体与频率控制汇刊》 **58**(7)，1377-88，2011年。7. Wiacek A、Oluyemi E、Myers K、Mullen L、Bell MAL，“基于相干性的波束形成提高了在乳腺超声检查中区分液体与实性肿块的诊断确定性”，《超声医学与生物学》 **46**(6)，1380–1394，2020年。8. Wiacek A、González E、Bell MAL，“CohereNet：用于超声空间相关性估计和基于相干性的波束形成的深度学习架构”，《*IEEE*超声、铁电体与频率控制汇刊》 **67**(12)，2574–2583，2020年。9. Nair AA、Washington K、Tran T、Reiter A、Bell MAL，“通过单个原始通道数据输入，利用深度学习同时生成超声图像和分割结果”，《*IEEE*超声、铁电体与频率控制汇刊》 **67**(12)，2493–2509，2020年。10. Bhatt M、Nair A、Kempski KM、Bell MAL，“直接基于原始体内数据进行超声图像形成与分割的多任务学习”，*2020*年*IEEE*国际超声研讨会论文集，线上，2020年9月6日至11日。11. Gubbi MR、Bell MAL，“基于深度学习的光声视觉伺服：将原始传感器数据的输出用作机器人控制器的输入”，*IEEE*国际机器人与自动化会议（*ICRA*），西安，中国，2021年5月30日至6月5日。12. Bell MAL、Huang J、Hyun D、Eldar YC、van Sloun R、Mischi M，“深度学习超声波束形成挑战赛（CUBDL）”，*2020*年*IEEE*国际超声研讨会论文集，2020年9月6日至11日。13. Hyun D、Wiacek A、Goudarzi S、Rothlübbers S、Asif A、Eickel K、Eldar YC、Huang J、Mischi M、Rivaz H、Sinden D、R.J.G. van Sloun、H. Strohm、Bell MAL，“超声图像形成的深度学习：CUBDL评估框架与开放数据集”，《*IEEE*超声、铁电体与频率控制汇刊》 **68**(12)，3466–3483，2021年。

# 32 — 让深度学习解决方案能够公平获取

Bruno M. Saraiva[1], Guillaume Jacquemet[2,3,4,5], Ricardo Henriques[1,6]

1. 古尔本基安科学研究所，奥埃拉什，葡萄牙 2. Turku Bioscience Centre，图尔库大学和奥博学术大学，图尔库，芬兰 3. 理工学院，细胞生物学，奥博学术大学，图尔库，芬兰 4. Turku Bioimaging，图尔库大学和奥博学术大学，FI- 20520 图尔库，芬兰 5. InFLAMES 研究旗舰中心，奥博学术大学，FI- 20520，图尔库，芬兰 6. MRC 分子细胞生物学实验室，伦敦大学学院，伦敦，英国

## 现状

机器学习领域一直是推动显微图像分析发展的重要助力，众多机器学习算法已能自动完成图像分割和分类等常见任务。近年来，随着深度学习（DL）技术的开发热潮，新的显微图像分析方法得以极其迅速地发展。DL 算法会处理数据——监督学习使用已标注的数据，无监督学习则使用未标注的数据——并通过自优化推断出数据特征，进而利用这些特征执行所需任务。实施得当时，它能让用户以空前的速度获得专家级性能。然而，DL 方法的实施高度依赖训练所用数据的质量和数量，通常也依赖高性能计算机的可用性。适当使用时，DL 技术在多种图像分析问题上都展现出卓越性能，例如分割（U-Net [1]；StarDist [2]）、分类（YOLOv2 [3]）、去噪（Noise2Void [4]）、复原（CARE [5]）和超分辨率，后者可通过超像素化或改进重建算法实现（DeepSTORM[6]）。

尽管深度学习在图像分析领域具有巨大影响力这一点毋庸置疑，但用户往往需要为闭源工具付费，或具备编程知识才能利用这些方法。这一障碍阻碍了深度学习技术在大多数研究领域的广泛应用。近年来，人们为将这些技术推广给非专业科学界、解决上述问题作出了多方努力。典型案例包括 DeepImageJ [7],，它专注于将预训练深度学习模型实现为 ImageJ/FIJI [8,9], 插件；ImageJ/FIJI 是使用最广泛的图像分析工具（**图32.1**）。另一个例子是 ZeroCostDL4Mic [10], ，它提供易于使用的 Google Colab 笔记本，用户无需编程知识即可训练和使用深度学习模型进行显微图像分析（**图32.1**）。由于 ZeroCostDL4Mic 在 Google Colab 上运行，它为用户提供了一种基于云的解决方案，无需专用硬件即可使用深度学习方法完成图像分析任务。除此之外，还有许多项目提供深度学习显微图像分析工具，例如 Cellpose [11], 、CSBDeep [12], 、DeepMIB [13], 等。

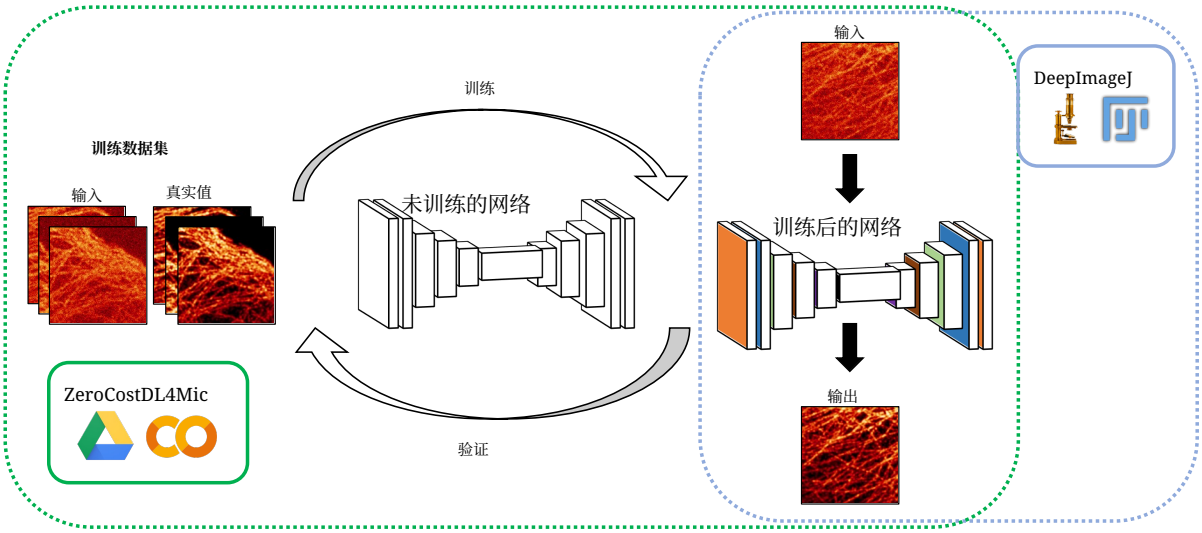


**图 32.1 ZeroCostDL4Mic 和 DeepImageJ 提供了无需编程知识即可使用的深度学习实现。** ZeroCostDL4Mic 结合使用 Google Drive 和 Colab，允许用户上传数据、训练模型，并在图像分析工作流程中使用训练后的模型。DeepImageJ 将多个预训练模型整合为 ImageJ/FIJI 插件的一部分，用户无需使用自己的数据训练深度学习模型即可使用这些模型。

## 当前与未来的挑战

尽管深度学习为研究人员提供了提升图像分析能力的新方法，但这项技术仍有不足之处，因此并非全球所有研究人员都能轻松使用。截至2022年10月，与仅以“显微镜成像”为关键词的出版物相比，以“深度学习显微成像”为检索关键词的出版物数量表明，即使能够使用图像采集设备，深度学习方法的使用和普及仍不广泛，其中美国和中国处于领先地位（**图 32.2**）。

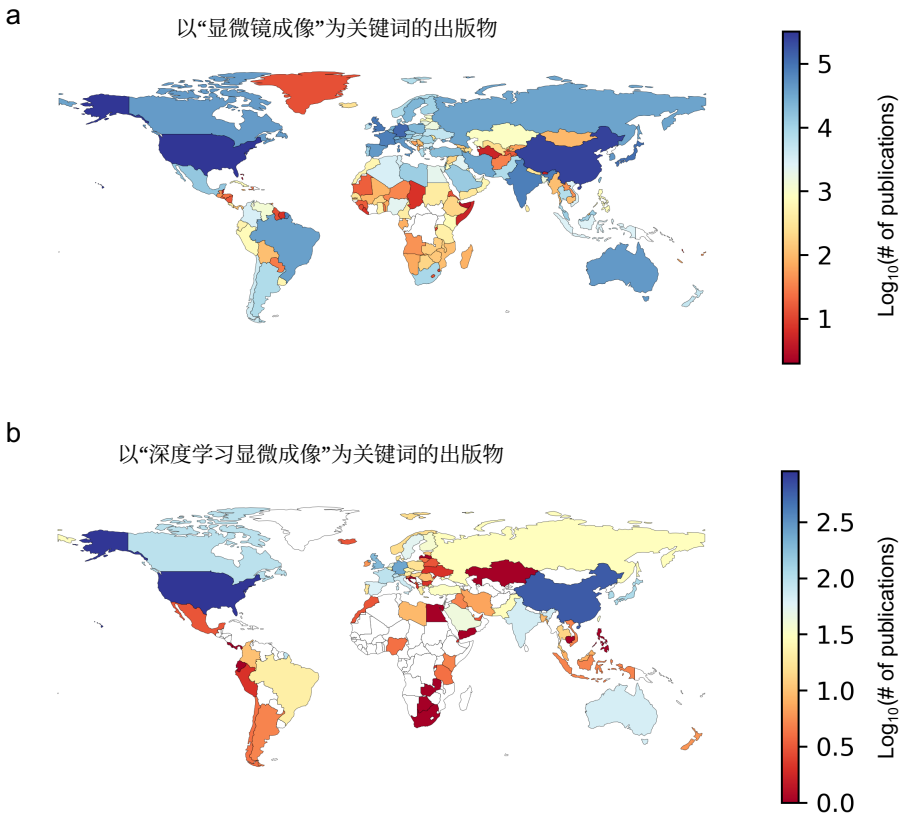


**图32.2 以“显微镜成像”或“深度学习显微成像”为关键词的出版物数量**。来源：出版记录来自 Web of Science（2022年10月），绘图使用 GeoPandas。白色表示未找到出版记录。

深度学习算法需要强大的计算能力，成本高昂，这对科研经费有限的研究人员构成了障碍。ZeroCostDL4Mic 可完全在 Google Colab 上运行，而 Google Colab 目前提供免费使用方案。不过，该方案限制了可使用的计算能力和存储空间，也无法保证这些限制不会改变，或深度学习方法不会发展到需要超出当前免费额度的资源。除了成本之外，实施和使用深度学习方法还会带来环境影响问题：其能源消耗相当高，同时硬件生产和分销也会产生碳排放。

TensorFlow 是开发深度学习方法的主要框架之一，主要由一家私营公司资助和开发。虽然目前它可能采用开源模式，但未来情况可能会改变。这可能首先造成获取方面的问题，并进一步加重实施深度学习解决方案的经济负担。此外，研究人员若要在研究中将深度学习用作工具，就必须具备编程和图像分析方面的技术知识。尽管 ZeroCostDL4MIC 和 DeepImageJ 免去了用户掌握编程知识的必要，但用户仍受限于使用其中包含的深度学习模型。近期，BioImage Model Zoo [14] 项目已启动，旨在为图像分析中的深度学习模型部署建立标准，并构建由社区推动的预训练模型数据库。尽管如此，即便能够使用预训练模型和几乎不需要编程知识的框架，用户仍需了解何时使用特定的深度学习模型、如何生成或获取并预处理所需数据、如何分析这些模型的输出，以及如何验证结果 [15]。考虑到深度学习方法依赖适当的数据集来训练模型，数据的生成、获取和存储也可能成为问题

原因是这些工作会产生相关成本。对于尚未熟悉深度学习领域的研究人员来说，这一切尤其具有挑战性。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习是一项功能强大的技术，但也给潜在用户带来了相当大的经济负担。因此，全球各地的研究人员尚无法普遍使用这项技术，尤其是那些难以获得科学研究经费的研究人员。DeepImageJ[7] 等项目通过为用户提供使用现有成熟预训练模型的途径，有助于减轻这一负担。然而，如果研究人员想要开展研究或使用新的深度学习模型，就必须有自己的解决方案。ZeroCostDL4Mic [10], 使用的 Google Colab 是一种选择。不过，其免费使用方案存在局限，而且完全依赖一家具有自身财务利益的私人公司所提供的服务。因此，创建由公共资金支持、全球研究人员均可使用的基于云的解决方案，将是让每位研究人员都能使用深度学习的关键。欧洲项目 AI4Life 致力于建设可持续的高质量研究基础设施和服务，通过搭建生命科学与计算机科学之间的桥梁，让生命科学研究人员能够使用深度学习图像分析工具。陈-扎克伯格倡议也在资助多个项目，将深度学习方法应用于 napari [16], ，以此支持生命科学研究人员。napari 是一款基于 Python 的开源图像处理工具。数据访问是深度学习的关键因素之一，也可能成为在显微镜成像中使用深度学习的制约因素。确保采集的数据符合 FAIR 原则（可发现、可访问、可互操作、可重复使用），有助于在整个科学界推动数据共享，并使缺乏生成所需数据条件的研究团队也能采用深度学习解决方案。Abdurahman 等 [17], 开展的研究就是数据共享能够产生实际影响的一个例子：他们利用公开可用的数据集，成功实施了一种深度学习策略，用于检测厚血涂片显微图像中的疟原虫。共享数据和预训练模型也将是减少深度学习所需强大计算能力所带来碳足迹的关键。

除了采用深度学习方法所带来的经济负担外，掌握利用这项技术所需的知识，也阻碍了深度学习在图像分析中的应用。image.sc 论坛就是一个由社区驱动的知识网络，能够为希望加深图像分析知识（包括深度学习实现方面知识）的新用户提供帮助和指导。在线课程和培训课程对于让每位研究人员都能接触深度学习也至关重要，因为这类课程本身相关成本较低，比需要线下参加的课程更具包容性，同时还能减少前往线下活动所产生的碳足迹。

**总结**

毫无疑问，深度学习彻底改变了显微图像分析领域。深度学习方法在许多传统图像分析任务中表现更出色，以前所未有的速度为研究人员带来最先进的性能。然而，由于实施深度学习方法需要特定的知识和设备，它仍不是所有研究人员都能轻松使用的工具。近来，一些项目通过消除使用深度学习进行显微图像分析所需的编程知识门槛，让深度学习方法变得更易于使用。尽管如此，仍有更多挑战有待解决。获取高质量数据是深度学习模型训练的基本前提。然而，并非所有研究团队都能获取深度学习方法所需的数据。理解何时以及如何使用深度学习、需要进行哪些预处理，也可能成为限制因素；建立一个由社区

推动的知识网络并开展相关方法的使用培训，或许能够解决这一问题。作为科学界的一员，我们需要共同努力，制定并实施相关策略，让全球科学界都能公平地使用深度学习。

**致谢**

*R.H.* 和 *B.S.* 获得古尔本基安基金会的支持，并获得欧盟委员会通过欧盟地平线*2020*研究与创新计划提供的欧洲研究委员会（*ERC*）资助（资助协议编号：*101001332*）、欧盟委员会通过地平线欧洲计划提供的资助（*AI4LIFE* 项目，资助协议编号：*101057970-AI4LIFE*）、欧洲分子生物学组织（*EMBO*）安装资助（*EMBO-2020-IG4734*）以及陈-扎克伯格倡议视觉蛋白质组学资助（*vpi-0000000044*）。*G. J.* 获得芬兰科学院（*G.J. 338537*）、芬兰癌症协会（*G.J.*）、奥博学术大学研究基金会（*G.J.*，*CellMech* 卓越中心）、奥博学术大学健康解决方案战略资助（*G.J.*）以及芬兰科学院 *InFLAMES* 旗舰计划（*G.J.*，*337531*）的支持。

**参考文献**

1. Falk, T. 等. “U-Net：用于细胞计数、检测和形态测量的深度学习。”《自然·方法》16, 67–70, 2019年。2. Schmidt, U., Weigert, M., Broaddus, C. & Myers, G. “利用星凸多边形进行细胞检测。”发表于 11071, 265–273, 2018年。3. Redmon, J. & Farhadi, A. YOLO9000：更好、更快、更强。预印本，https://doi.org/10.48550/arXiv.1612.08242，2016年。4. Krull, A., Buchholz, T.-O. & Jug, F. “Noise2Void——从单张噪声图像中学习去噪。”预印本，https://doi.org/10.48550/arXiv.1811.10980，2019年。5. Weigert, M. 等. “内容感知图像复原：突破荧光显微镜的极限。”《自然·方法》15, 1090–1097, 2018年。6. Nehme, E., Weiss, L. E., Michaeli, T. & Shechtman, Y. “Deep-STORM：利用深度学习实现单分子显微镜超分辨率。”Optica 5, 458–464, 2018年。7. Gómez-de-Mariscal, E. 等. “DeepImageJ：在 ImageJ 中运行深度学习模型的用户友好环境。”《自然·方法》18, 1192–1195, 2021年。8. Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. & Eliceiri, K. W. “ImageJ 生态系统：用于生物医学图像分析的开放平台。”Mol. Reprod. Dev. 82, 518–529, 2015年。9. Schindelin, J. 等. “Fiji：用于生物图像分析的开源平台。”《自然·方法》9, 676–682, 2012年。10. von Chamier, L. 等. “借助 ZeroCostDL4Mic，让显微镜成像领域的深度学习大众化。”《自然·通讯》12, 2276, 2021年。11. Stringer, C., Pachitariu, M. “Cellpose 2.0：如何训练自己的模型。”2022.04.01.486764 预印本，https://doi.org/10.1101/2022.04.01.486764，2022年。12. Weigert, M., Schmidt, U., Boothe, T. 等. “内容感知图像复原：突破荧光显微镜的极限。”《自然·方法》15, 1090–1097, 2018年。13. Belevich, I., Jokitalo, E. “DeepMIB：用于训练生物图像分割深度学习网络的用户友好型开源软件。”2020.07.13.200105 预印本，https://doi.org/10.1101/2020.07.13.200105，2020年。14. Ouyang, W. 等. “BioImage Model Zoo：由社区驱动的资源，助力生物图像分析领域的普及型深度学习。”2022.06.07.495102 预印本，https://doi.org/10.1101/2022.06.07.495102，2022年。

15. Laine, R.F., Arganda-Carreras, I., Henriques, R. 等. “避免深度学习生物图像分析领域的重复危机。”《自然·方法》 **18**, 1136–1144, 2021年。16. napari 贡献者（2019）。napari：适用于 Python 的多维图像查看器。doi:10.5281/zenodo.3555620。17. Abdurahman, F., Fante, K.A. & Aliy, M. “使用改良的 YOLOV3 和 YOLOV4 模型检测厚血涂片显微图像中的疟原虫。”*BMC*生物信息学 **22**, 112, 2021年。

# 33 — 深度学习应用部署

Wei Ouyang[1], Trang Le[2]

1. 生命科学实验室、应用物理系，KTH 皇家理工学院，瑞典斯德哥尔摩 171 65 2. 生物工程系，斯坦福大学，美国加利福尼亚州斯坦福 94305

**状态**

由于性能卓越，深度学习模型在显微图像分析中迅速普及。尽管深度神经网络在广泛的任务中表现出色，但运行它们所需的数据量和计算量给软件设计与部署带来了前所未有的挑战，尤其是在训练阶段。大多数深度学习方法都基于少数几种广受欢迎的深度学习框架实现，包括 PyTorch [1] 和 TensorFlow [2], , 这些框架均以 Python 实现。这些方法的源代码被打包到代码仓库中，并通过 GitHub 等在线平台以宽松许可证共享。深度学习领域的开放性极大地促进了热门模型的广泛传播和进一步发展，如今这已成为一种普遍做法。

除了原始 Python 代码外，Jupyter Notebook [3], 也常用于展示配套代码仓库中接口函数的用法。这类可执行文档会将源代码拆分成多个部分，并在各部分周围配上说明文字。Notebook 广泛用于教育，也常见于显微图像分析的实践工作坊和教程中。为提高可复现性，Binder [4] 和 Google Colaboratory 等基于容器的云执行服务免费提供，已成为深度学习应用部署中的宝贵资源。尤其是 Colaboratory，它提供免费的图形处理器，非常适合用于分发深度学习工具。事实上，ZeroCost4Mic [5], 便使用了 Colaboratory；该项目提供了一系列经过筛选的 Notebook，用户可通过 Colaboratory Notebook 中的交互式用户界面元素进行配置，以运行基于深度学习的显微图像分析。

虽然使用 Python 源代码或 Jupyter Notebook 都很灵活，但编程经验较少的用户仍可根据开发者提供的说明轻松调整工具。对于没有编程技能的用户而言，要调整代码或 Notebook，使其能够与 ImageJ [6], 等传统软件协同工作，并融入更完整的分析工作流，仍然颇具挑战。尽管要在 Python 以外的编程语言中运行深度学习并不容易，但 DeepImageJ [7] 等基于 Java 的解决方案已应运而生。为满足这一需求，napari8 正在开发中，并逐渐获得社区关注。它是一款基于 Python 的图像分析软件，受到陈-扎克伯格倡议的支持。该项目旨在提供一个快速、交互式的多维图像查看器，用于浏览、标注和分析大型多维图像。

此外，由于深度学习方法需要大量数据和计算，网络和云计算对于进一步扩展应用日益重要，使其能够处理海量数据集，并几乎不受限制地访问数据存储和计算能力。在这方面，I mJoy [9], CDeep3M [10], 和 DeepCell Kiosk [11] 等基于 Web 的平台应运而生，旨在支持在服务器端运行的深度学习应用。由于计算由 IT 专家或开发人员维护的远程服务器执行，用户几乎无需进行任何设置即可使用这些工具；在大多数情况下，只需通过网页浏览器访问用户界面即可。这种部署方式比传统桌面软件更具可扩展性，但需要将可能大量的数据传输到远程服务器，而这可能

受到互联网连接带宽的限制，也会带来服务器端数据机密性和隐私方面的问题。在实践中，为了避免在本地与远程环境之间移动数据，并实现更完整的分析工作流，用户还需要功能更丰富、可完全在网页浏览器或云端运行的软件。

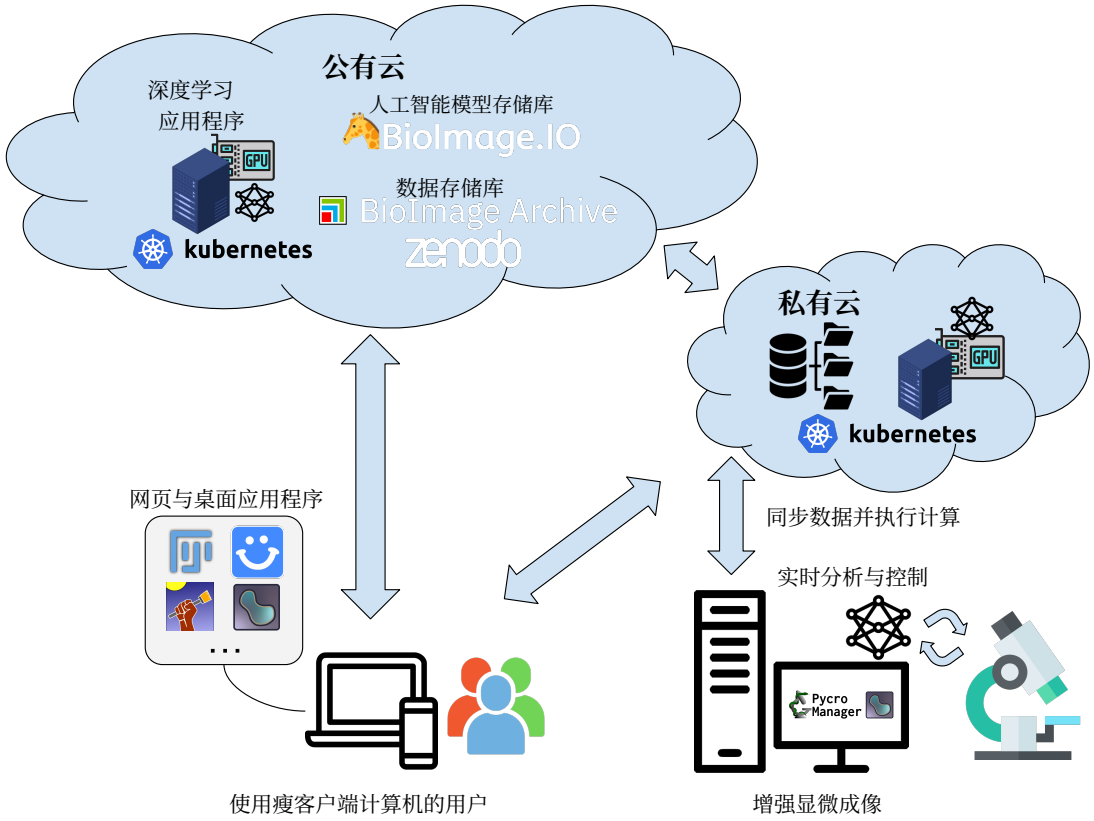


**图 33.1 用于部署显微镜成像深度学习工具的可扩展、由 Web 驱动的计算系统**。为了构建和部署深度学习工具，以便借助计算量大的模型处理海量数据，我们需要在公有云或私有云环境中设计分布式系统。本地工作站用于控制显微镜并采集数据；在增强显微成像场景中，还可以使用深度学习工具（例如，使用 Pycro-Manager 或 napari 构建的工具）实时执行实时图像分析，并生成用于控制显微镜的反馈信号。在同一机构网络内，数据将同步至中央数据管理系统，并使用部署为容器、由 Kubernetes 管理的私有计算集群中的深度学习工具进行进一步分析。与出版物一同提供的数据还可以发布到公有云（互联网）中的数据存储库，例如 BioImage Archive 或 Zenodo；相应的深度学习模型则可以发布到 BioImage Model Zoo（位于 BioImage.IO）。工具部署在公有云服务器上，以提供数据管理和标注、深度学习模型训练和推理等服务。使用瘦客户端计算机（包括便携式笔记本电脑和移动设备）的用户，通过 Web 应用或桌面应用访问运行于公有云或私有云服务器上的网络服务。由于繁重的计算和海量数据均由服务器处理，用户可以使用网页浏览器执行数据管理、标注和分析任务，例如在 ImJoy 中进行这些操作。

### 当前与未来的挑战

目前，整个社区迫切需要共同努力，解决深度学习工具部署方面的挑战。对于桌面软件而言，挑战包括如何交付软件包、处理复杂的依赖项、简化安装过程，以及确保软件能够在多种主流操作系统下可靠运行。基于 Web 和服务器的部署选项正变得越来越普遍。通过将设置复杂软件环境以及访问云存储和计算资源的任务交由 IT 专家完成，这些选项缓解了部署问题。

面向未来的显微镜成像人工智能系统需要一个可扩展、兼容人类的框架。要处理不断增长的数据量，势必需要使用由机构 IT 部门托管或部署在云端的集中式计算集群。与此同时，用户往往会使用“轻量级”

客户端，例如笔记本电脑、平板电脑或移动设备，来访问这些服务。与用户界面和计算代码耦合在同一软件模块中的传统桌面软件不同，面向云端的软件需要在设计模式上做出重大改变，将用户界面与计算部分分离。如**图 33.1**所示，用户界面部分运行在用户的网页浏览器或桌面客户端中，而主要部分包含深度学习模型及其他繁重的计算任务，这些任务运行在公共或私有计算集群中的一台或多台远程服务器上。这两个部分需要通过互联网通信进行同步，而且通常使用不同的编程语言实现，例如，界面部分使用 HTML/CSS/JavaScript，计算部分则使用 Python。为了让下一代显微图像分析工具开发者更顺利地完成这一转变，社区可能需要协同努力，创建工具和平台，并编制教育材料，以简化这一过程。

此外，在分发深度学习工具时，降低计算成本并使机器学习训练更加环保，也是需要考虑的重要方面。与此同时，对于患者相关显微图像，数据机密性和隐私则构成了部署深度学习工具时面临的另一类挑战。

**应对挑战的科学技术进展**

为应对复杂依赖项给桌面软件分发带来的挑战，人们采用类 Conda 虚拟环境或基于容器的解决方案作为替代方案，但代价是软件包体积增大。例如，为了利用 ImageJ 社区现有的 Java 开发者，pyimagej 项目正在开展一项工作，在 Python 与 Java 之间搭建桥梁，以便将深度学习模型轻松集成到 ImageJ 中。Pycro-Manager 是另一款软件，它将 Python 与 Micro-Manager 连接起来，进一步支持在图像采集过程中进行由实时深度学习驱动的图像分析和反馈控制（**图 33.1**）。与此同时，由于其中包含针对特定操作系统编译的二进制文件，因此无法保证它在所有情况下都能正常运行。对于基于云的解决方案，以 Kubernetes 为代表的容器编排平台正逐渐成为机构信息技术部门和学术云服务提供商的事实标准，为开发者提供托管环境，以部署其深度学习工具。Kubeflow 和 NVIDIA Triton 推理服务器等人工智能模型训练与服务软件，让人工智能模型更易于投入生产环境，并通过基于 HTTP 的接口远程运行。对于数据机密性，私有计算集群（如**图 33.1**所示）或许能应对部分挑战，而联邦学习 [12] 则能在数据保存在各自数据湖中的同时，训练出强大的模型。

为促进人工智能模型的共享，人们开发了 BioImage Model Zoo [13](https://bioimage.io) 等代码仓库，以便共享预训练模型；同时，软件厂商也加入联盟，共同定义通用模型格式，实现跨兼容性。这些努力使深度学习模型更易于分发，并可在多种软件中使用。同时，直接复用现有模型，或将其作为训练的热启动，都能大幅减少模型开发工作，并进一步为应对气候变化作出贡献。此外，人们还采用知识蒸馏等模型压缩技术来减小模型尺寸、加快模型执行速度，例如在增强显微成像中提供实时反馈。

在浏览器中，打造功能丰富、强大的用户界面正变得越来越简单可靠。WebAssembly 可以让使用 C/C++、Rust 等语言编写的基础科学软件包在浏览器中编译和运行。它使我们能够重复利用 numpy、scipy、pandas 和 scikit-image 等 Python 库，直接在网页浏览器中加载和处理图像，并

为打造易于使用且功能强大的浏览器内图像分析工具铺平了道路。ImJoy 是一个旨在充分利用 Web 生态系统的框架，并提供远程过程调用层，以连接在浏览器或远程服务器上运行的插件。基于 ImJoy，我们开发了 ImageJ.JS（https://ij.imjoy.io），它是通过将 Java 版 ImageJ 编译为 JavaScript 构建的，目前每天有 ~1000 位用户使用。

**总结**

借助 OpenAI GPT-3、Codex [14] 或 ChatGPT 等大型自然语言模型，可以根据普通英语生成 Python 和 JavaScript 等多种编程语言的可执行源代码。这为未来的深度学习工具开发者打开了一扇新的大门，使他们能够创建简化的语音或聊天机器人式界面，从而降低用户界面设计的复杂度，并让工具更加灵活、更符合人类使用习惯。然而，运行大型模型所需的庞大规模和计算资源，实际上使预算有限的研究机构难以使用这些模型，也让科技巨头成为“自然垄断者”。更广泛的人工智能社区需要携手努力，探索未来的发展道路。

总的来说，人工智能解决方案在显微成像领域的广泛应用，正推动范式转变，迈向由人在回路人工智能驱动的增强显微成像未来，并深刻改变我们理解生物学的方式，以及我们为精准医疗和医疗保健作出贡献的方式。

**致谢**

本研究由克努特与爱丽丝·瓦伦堡基金会资助（资助编号：*2016*年*-0204*和*2018*年*.0172*）。

**参考文献**

1. Paszke, A. 等：《PyTorch：一种命令式风格的高性能深度学习库》。arXiv 1912.01703 Cs Stat，2019年。2. Abadi, M. 等：《TensorFlow：异构分布式系统上的大规模机器学习》。3. Kluyver, T. 等：《Jupyter Notebook——可复现计算工作流的出版格式》。载于《学术出版中的定位与权力：参与者、智能体与议程》（编者：Loizides, F. 和 Schmidt, B.），87–90，2016年。4. Jupyter, P. 等：《Binder 2.0——面向大规模科学研究、可复现、可交互且可共享的环境》。第 *17* 届 *Python* 科学会议论文集，113–120，2018年。5.《借助 ZeroCostDL4Mic 推动显微镜成像深度学习普及》，《自然·通讯》。https://www.nature.com/articles/s41467-021-22518-0。6. Schneider, C. A., Rasband, W. S. 和 Eliceiri, K. W. 美国国立卫生研究院：《从 Image 到 ImageJ：图像分析的 25 年》。《自然·方法》 **9**，671–675，2012年。7.《DeepImageJ：在 ImageJ 中运行深度学习模型的友好环境》，《自然·方法》*style*>。*https://www.nature.com/articles/s41592-021-01262-9*。*8. Perkel, J. M.*：《*Python* 助力升级：新图像工具可视化复杂数据》。*Nature* **600**，347–348，2021年。9. Ouyang, W., Mueller, F., Hjelmare, M., Lundberg, E. 和 Zimmer, C.：《ImJoy：面向深度学习时代的开源计算平台》。《自然·方法》 **16**，1199–1200，2019年。10. Haberl, M. G. 等：《CDeep3M——用于图像分割的即插即用云端深度学习》。《自然·方法》 **15**，677–680，2018年。11. Bannon, D. 等：《DeepCell Kiosk：利用 Kubernetes 扩展深度学习驱动的细胞图像分析》。《自然·方法》 **18**，43–45，2021年。

12. Sheller, M. J. 等：《医学中的联邦学习：在不共享患者数据的情况下促进多机构协作》。《科学报告》 **10**，12598，2020年。13. Ouyang, W. 等：《BioImage Model Zoo：由社区驱动的生物图像分析便捷深度学习资源》。*bioRxiv* 2022.06.07.495102，2022年。14. Chen, M. 等：《评估基于代码训练的大型语言模型》。*arXiv* 2107.03374 Cs，2021年。

## 34 — DeepTrack 2

Benjamin Midtvedt[1], Jesus Pineda[1]

1. 瑞典，哥德堡大学物理系

### 状态

两项相对较新的进展使人们能够对微观世界进行定量分析[1,2]。首先，数字视频显微术让研究人员能够以数字形式呈现视觉数据，并将其记录下来以供后续分析。其次，计算能力的迅猛提升使得对视频记录进行昂贵的高维分析成为可能。

得益于深度学习的强大能力，近年来显微镜视频数据分析领域出现了新一轮发展。事实上，深度学习在显微镜成像中的许多常见任务上都展现出卓越的性能，例如细胞计数、目标检测、细胞形态测量、轨迹重建、超分辨率显微镜技术、诊断、目标分类以及跨模态变换[3,4]。然而，深度学习尚未被广泛用作数字显微成像中的分析工具，主要原因是针对显微镜数据开发定制化深度学习解决方案的入门门槛很高。

在此，我们介绍 DeepTrack 2，这是一个配备了构建完整端到端显微镜分析流水线所需全部工具的开源 Python 库 [1]。此类旨在从生物数据中提取机制信息和时空信息的流水线通常包含以下步骤：

1. 对图像进行处理，为分析做好准备。2. 检测并测量感兴趣对象，以提取形态和强度信息。3. 将不同视频帧中的检测结果连接起来，形成轨迹。4. 结合时间分辨信息，获取局部和全局性质的测量结果。

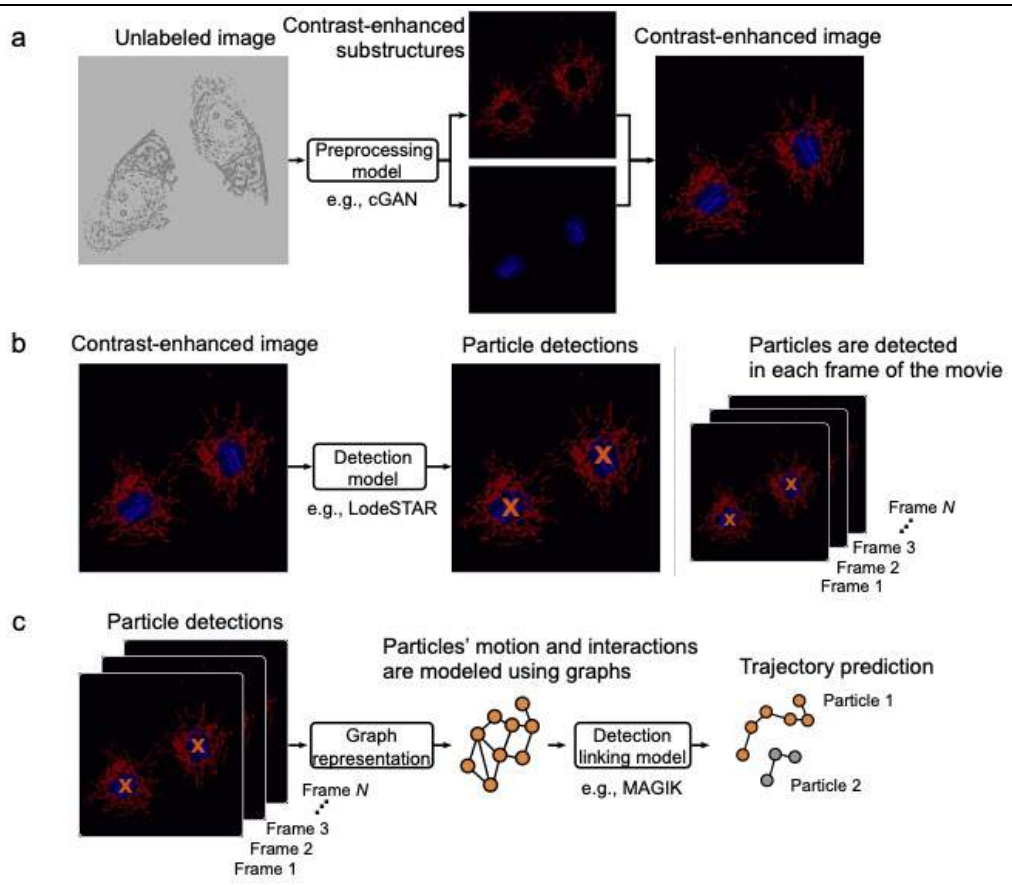


**图34.1 DeepTrack 2 集成了一个深度学习生态系统，可用于端到端显微镜数据分析。** **(a)** 输入图像可选择通过图像到图像神经网络进行处理，例如突出显示感兴趣区域。**(b)** 检测并标记视频每一帧中的感兴趣结构（此处为细胞核）（橙色标记）。**(c)** 使用图神经网络将每一帧中的检测结果关联起来，从而形成随时间变化的轨迹。

DeepTrack 2 为此处理流程的每个步骤提供深度学习解决方案，使具有不同编程经验的用户都能根据自己的数据、目标和挑战使用并优化现有解决方案。对于步骤 1，DeepTrack 2 集成了数据归一化、噪声抑制、数据增强等工具，以及虚拟染色等更先进的方法，以生成高对比度、高特异性的图像（**图34.1a**）。对于步骤 2，DeepTrack 2 附带了可直接用于训练的最先进模型，例如用于无标记粒子检测的 LodeSTAR [5] 、用于语义分割的 U-Net，以及用于同时进行检测和分类的 YOLO（**图34.1b**）。对于步骤 3 和 4，DeepTrack 2 使用 MAGIK [6]，这一最先进的基于图的网络，它既能将观测结果连接成轨迹，也能从时空数据中提取有关系统动力学的信息（**图34.1c**）。

近期研究已证明，DeepTrack 2 有助于分析显微镜数据。例如，**图34.2a**展示了如何利用条件生成对抗神经网络（cGAN）[7]，从易于采集且成本低廉的明场图像中进行虚拟染色，从而呈现复杂生物系统的高质量可视化结果；**图34.2b**展示了如何仅凭一张未标注图像，利用 LodeSTAR 实现近乎完美的目标检测[5]；**图34.2c**则展示了如何利用 MAGIK 等图神经网络，将检测结果连接成轨迹，即使细胞发生分裂也不例外[6]。此外，DeepTrack 2 还用于通过全息显微术图像表征微型浮游生物[8] ，以及监测活性液滴类——一种新型活性物质系统[9]。

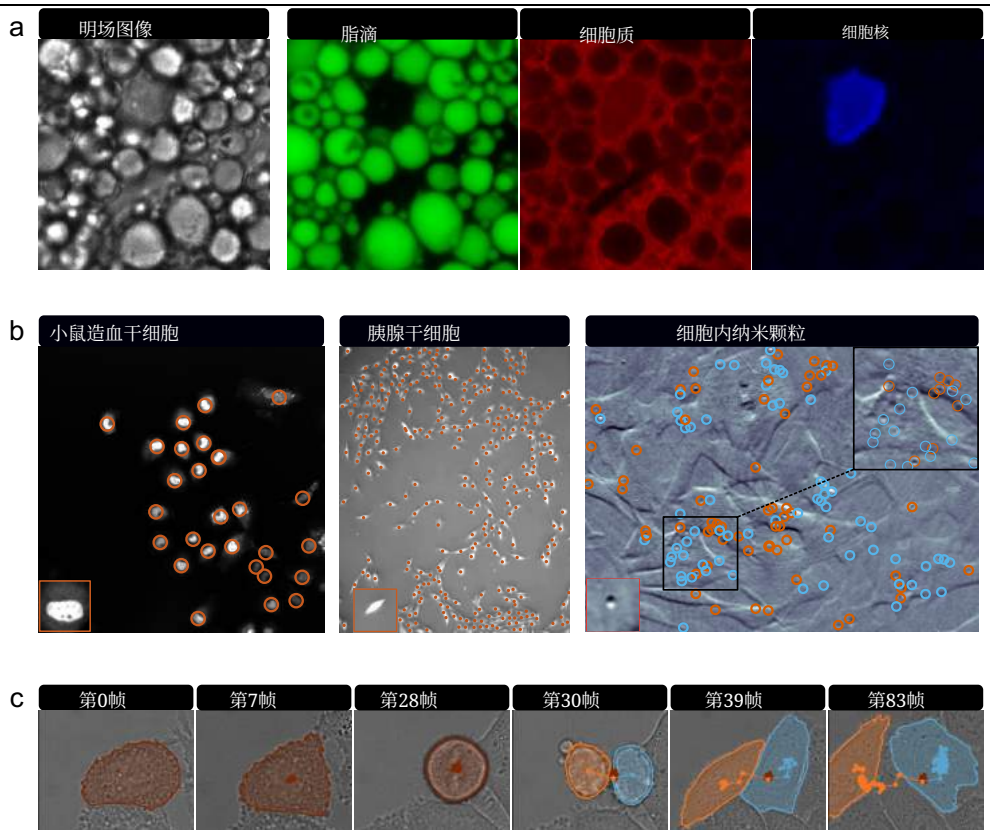


**图34.2 DeepTrack 2 分析实验数据。** **(a)** 对脂肪细胞的明场图像进行虚拟染色，以突出显示脂滴、细胞质和细胞核 [7]。(b) LodeSTAR 通过无监督学习检测小鼠干细胞（尽管细胞之间变异性很大）、胰腺干细胞（尽管样品排列紧密），以及细胞内聚苯乙烯颗粒（橙色标记）和生物结构（蓝色标记），尽管信噪比较低 [5]。在所有情况下，LodeSTAR 都使用相应插图中显示的单个裁剪区域进行训练，然后应用于整幅图像。c MAGIK 学习追踪 HeLa 细胞（尽管细胞形态各异），即使细胞正在分裂也能做到 [6]。

**当前与未来的挑战**

向深度学习增强分析的转变并非毫无挑战。首先，成像模态和目标样本之间存在高度变异性，这使得公开可用数据集无法成为可靠的训练数据来源。数据集必须包含相同的目标对象，使用近乎相同的光学设备成像，并标注所需的真实值。而这些条件同时满足的可能性微乎其微。

其次，对于许多应用而言，分析所需达到的质量超过了人工精确度。例如，超分辨率显微镜技术和力校准中的对象亚像素定位、噪声图像中的目标检测、三维显微成像等。因此，即使是高质量的人工标注，也不足以训练这些神经网络。

第三，神经网络被称为黑箱函数可谓名副其实，这使人们对其在临床和工业应用中的可靠性产生质疑。因此，深度学习一直难以超越研究工具的范畴，获得更广泛的应用。究其根本，这是因为神经网络只能给出答案，却很少解释得出该答案的过程。

最后，方法和模型架构的快速发展导致该领域缺乏统一接口，呈现出零散分布的局面。因此，比较不同方法极其困难。此外，将深度学习方法复用于新数据时，往往需要从头重新实现，这对非专家而言是一项艰巨的任务。

这四项挑战共同导致新型深度学习方法的采用进展缓慢，尽管它们在性能方面具有显著优势。DeepTrack 2 试图通过三管齐下的方式解决这些问题：

1. 使用合成数据训练神经网络，在生成完美真实标注的同时，减少对标注数据的依赖 [1,8]。
2. 开发无标记、少样本且可解释的模型，推动成本更低、透明度更高的神经网络方法 [5,6]。
3. 将各种方法整合到统一的接口中，持续实现最先进的方法，并鼓励作者贡献自己的方法 [10]。

**应对挑战的科学技术进展**

我们确定了三个对充分发挥深度学习在定量显微术中的潜力至关重要的研究方向：

1. 进一步开发无监督或自监督方法，尤其是用于分割、轨迹重建和分类等任务的方法。尽管自蒸馏和对比学习等方法已为这些发展奠定了基础，但它们尚未针对显微镜成像的具体挑战进行优化。2. 开发可解释的神经网络。近期兴起的基于注意力的神经网络，使神经网络的透明度远胜以往。注意力神经网络能够突出数据中促成特定结论的部分，从而让人了解得出答案的原因。目前，这种方法主要用于分类任务。然而，我们认为，类注意力机制完全可以融入为显微镜成像中的其他任务而设计的神经网络，从而显著提高其可解释性，进而增强神经网络的可信度。3. 为各种光学器件设计先进的仿真方法。与复杂得难以模拟的宏观世界不同，微观世界的物理学完全可以切实地进行全面模拟。因此，通过开发更快速、更准确的仿真技术，便可彻底免除对标注数据的需求。

**总结**

深度学习无疑是定量显微术的有力工具。然而，它仍停留在研究工具的阶段，尚未进入临床医生的手中。我们指出，要充分发挥深度学习在定量显微术中的潜力，仍需克服四项关键挑战：获得可靠的训练数据来源，其通用性足以匹配终端用户的具体问题和实验设备；开发一种训练神经网络的方法，使其在标注方面的准确度超越人类准确度；开发更透明的模型；以及提供用于使用这些模型的统一接口。

我们也认为，该领域已具备良好条件来应对这些问题。自监督方法日益兴起，注意力层等可解释层正逐渐引领该领域。针对显微镜成像对这两种方法进行定向开发，或可推动可靠的深度学习方法得到广泛应用，并以无监督的方式揭示数据中蕴含的物理和生物学洞见。

**参考文献**

1. Midtvedt, B., Helgadottir, S., Argun, A., Pineda, J., Midtvedt, D., & Volpe, G. “利用深度学习进行定量数字显微术。”《应用物理评论》 **8**(1), 011310, 2021年。

2. Patterson, D. 等。“碳排放与大型神经网络训练。” arXiv 预印本 2104.10350，2021年。 3. Moen, E., Bannon, D., Kudo, T., Graf, W., Covert, M., & Van Valen, D. ” 用于细胞图像分析的深度学习。”《自然·方法》 **16**(12), 1233-1246, 2019年。 4. Midtvedt, D., Mylnikov, V., Stilgoe, A., Käll, M., Rubinsztein-Dunlop, H., & Volpe, G. “光–物质相互作用中的深度学习。”《纳米光子学》 **11**(14), 3189-3214, 2022年。 5. Midtvedt, B., Pineda, J., Skärberg, F., Olsén, E., Bachimanchi, H., Wesén, E., ... & Volpe, G. “单次自监督粒子追踪。” arXiv 2202.13546，2022年。 6. Pineda, J., Midtvedt, B., Bachimanchi, H., Noé, S., Midtvedt, D., Volpe, G., & Manzo, C. “几何深度学习揭示微观运动的时空指纹。” arXiv 2202.06355，2022年。 7. Helgadottir, S., Midtvedt, B., Pineda, J., Sabirsh, A., B. Adiels, C., Romeo, S., Midtvedt, D., & Volpe, G. “利用深度学习从明场细胞图像中提取定量生物学信息。”《生物物理学评论》 **2**(3), 031401, 2021年。 8. Bachimanchi, H., Midtvedt, B., Midtvedt, D., Selander, E., & Volpe, G. “ 全息显微术与深度学习揭示的微型浮游生物生活史。” arXiv 2202.09046，2022年。 9. Grauer, J., Schmidt, F., Pineda, J., Midtvedt, B., Löwen, H., & Volpe, G., & Liebchen, B. “活跃

e

液滴体。”《自然·通讯》**12**，6005，2021年。10. Midtvedt, B.、Helgadottir, S.、Argun, A.、Pineda, J.、Midtvedt, D. 与 Volpe, G.，《Deeptrack-2.0》，https://github.com/softmatterlab/DeepTrack-2.0（2020年）。

## 35 —DeepImageJ

Estibaliz Gómez-de-Mariscal[1], Daniel Sage[2], Arrate Muñoz-Barrutia[3,4]

1. 古尔本基安科学研究所，葡萄牙奥埃拉什 2. 生物医学成像组与 EPFL 成像中心，洛桑联邦理工学院（EPFL），瑞士洛桑 3. 马德里卡洛斯三世大学生物工程系，西班牙莱加内斯 4. 格雷戈里奥·马拉尼翁卫生研究所，西班牙马德里

### 状态

与其他科学领域一样，深度学习（DL）在许多显微图像处理任务中取得了卓越的性能 [1,2]。它在复杂图像中揭示视觉特征的潜力，改变了显微图像分析的格局；当这些视觉特征难以由人类解释时，尤其如此，例如图像复原（如 CARE [3]）、全连接层细胞核检测（如 Star Dist [4]）、超分辨率定位显微术（如 DECODE [5]）或关联显微成像。尽管近期将深度学习应用于显微成像的研究成果赋予研究人员构建强大分析流程的能力，但对于绝大多数最终用户而言，信息技术门槛仍然过高。要充分利用这项新技术，需要具备技术能力和编程专业知识。生命科学家通常不熟悉 Python——这是深度学习框架（TensorFlow、PyTorch）的首选语言。相较之下，他们更青睐 ImageJ [6], 、Icy [7], 或 QuPath [8] 等基于 Java 的软件所提供的友好用户界面。ImageJ 目前是细胞成像领域使用最广泛的软件，因为它提供了丰富的生物图像分析工具。此外，它还能在独特的生态系统中与许多其他平台互操作，包括显微镜驱动程序和数据分析软件包。然而，Java 的硬件限制使其无法成为采用机器学习进行生物图像分析的首选工具。因此，ImageJ 用户一直无法在其图像分析流程中部署深度学习技术。

近几年，已有多项举措致力于将深度学习功能集成到 ImageJ 中。多个团队（DeepClass4Bio [9], CSBDeep [3], deepImageJ [10]）正努力通过 ImageJ插件或 ImageJ宏提供对预训练深度学习模型的访问。在 ImageJ 的环境中，deepImageJ 是预训练深度学习模型的通用使用工具。另一方面，一些成熟的 ImageJ插件也已将深度学习集成到其流程中。例如，TrackMate [11] 已加入使用 CellPose 或 StarDist 进行细胞分割的功能，以扩展跟踪流程的灵活性。最后，BioImage Model Zoo [12] 是一项基于社区的倡议，旨在让用户有效使用深度学习技术。它提出了一种专为生命科学家设计的标准化格式，方便他们在各种开放式生物图像分析软件（如 ImageJ、Ilastik [13], ImJoy [14],ZeroCostDL4Mic [15], QuPath）之间共享和部署训练好的深度学习模型。

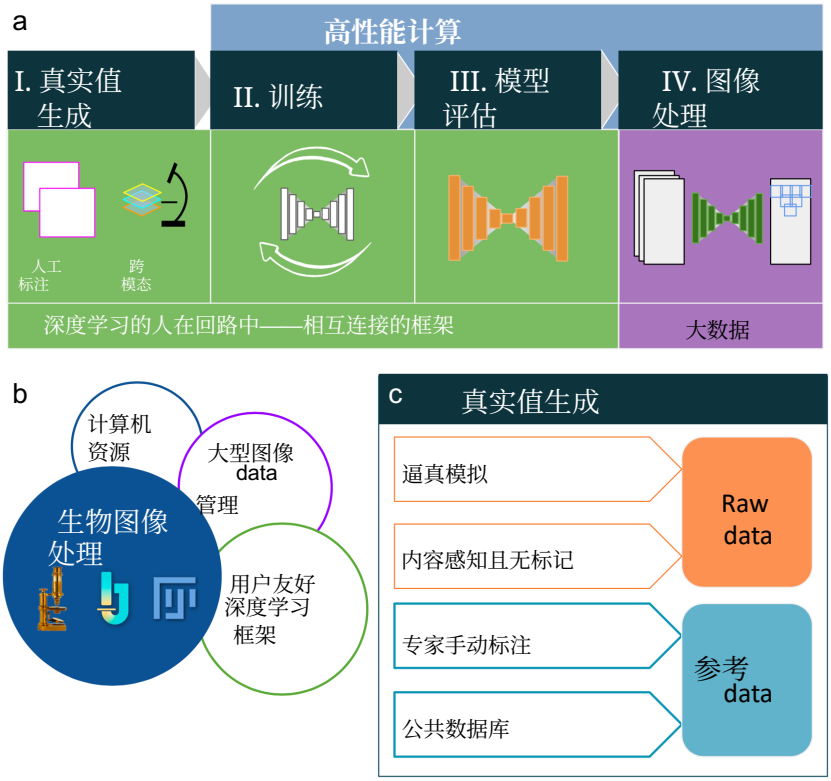


**图 35.1 图像分析工作流程及缺失的关键环节。**（**a**）获取功能性深度学习模型的一般工作流程及相应的开发步骤。（**b**）在 ImageJ 中实现深度学习赋能的生物图像分析所缺少的关键环节及亟待推进的领域：计算机资源，以支持步骤 II 至 IV；大数据管理，以支持步骤 IV 中的更多功能；易于使用的深度学习框架，以支持步骤 II 至 IV。（**c**）获取深度学习模型训练所需数据的策略：利用物理模型进行逼真模拟；采用基于内容的方法设计显微成像采集；耗时的专家标注或众包标注；通过图像分析挑战赛和开放出版物获取公开可用数据集。

## 当前与未来的挑战

我们发现，要在显微图像分析中全面集成深度学习，面临着两个层面的挑战。当前的深度学习方法有望突破显微图像采集的局限 [3,5]。然而，其性能取决于数据的质量和数量，包括采集的原始图像以及经过标注的图像或参考图像（**图 35.1c**）。通常，采集科学图像是为了回答特定的生物学问题。遗憾的是，研究人员往往等到所有图像采集完成后，才开始寻找合适的分析方法。我们设想，如果在项目初期就整合数据分析，便能显著提升成像工作流程的鲁棒性（**图 35.1a**）。当图像是图像分析任务的核心时，数据中心方法尤其需要这样做。为此，应妥善设计采集方案，并纳入大量具有变异性的示例，从而减少获得科学结果所需的时间和精力。

常规部署深度学习方法并非易事。ImageJ 生态系统中的重要技术空白（**图 35.1b**）包括：1）缺乏用户引导式训练；2）无法轻松地在大尺寸图像上使用深度学习模型；3）与高性能计算资源（图形处理器）的连接；以及 4）无法将深度学习模型交互式地嵌入复杂的生物图像分析流程。同样，要更有效地将深度学习融入生物图像分析流程，主要依赖于从业者在机器学习和图像分析方面的教育。在实践中，必须训练研究人员掌握恰当的应用场景，并提醒他们注意深度学习技术的局限性和风险。疫情大大促进了人们参与录制的在线课程（Neubias Academy、EMBO 和 EMBL），也推动了良好实践用户指南的编写。社区需要保持

这一势头，继续传播这些知识。因此，如何根据用户的需求，围绕数据采集和用于分析的实用计算工具，将现有的深度学习知识与技术调整到位，是一项至关重要的挑战。

作为人工智能（AI）技术的一部分，深度学习是一个非常活跃的领域。如何为将来在 ImageJ 中集成新方法做好准备，仍然是一大瓶颈。目前仍缺少的一些技术包括：1）人在回路，2）自动机器学习（AutoML），3）自监督或弱监督训练，以及 4）生物颗粒追踪。归根结底，下一代深度学习方法致力于实现智能工作流，将先验知识融入引导式分析，或利用一些稀疏信息开展弱监督训练。所有这些进展都需要对深度学习和生物成像都有深入理解，因此开发者与最终用户之间的紧密合作至关重要。因此，如何充分发挥深度学习的潜力，实现面向生物医学研究的智能成像，是一项重大挑战。

**应对挑战的科学技术进展**

深度学习需要大量数据，而其可重用性只能通过模型训练或微调来实现。学术界日益重视获取可发现、可访问、可互操作和可重用（FAIR）数据。面向深度学习模型训练的公开数据库数量不断增加，其中计算机视觉领域的增长速度快于显微镜成像领域（Data Science Bowl[2], MONAI (https://monai.io)）。数据生成器和模拟器也是获取用于训练的显微图像的另一种来源；当成像模型的物理定律已得到明确识别时，这种方法尤其适用。

神经网络的性能取决于可用数据量，或能否获取经过验证的训练模型。例如，特定测量所需的分辨率和信噪比会因待分析的结构而异。一些研究为这些特征提供了指导，帮助研究人员优化图像采集 [3-5]。此外，近期的方法着重于调整图像中的内容——即内容感知方法 [3]。其目的是突破数据采集的限制，从更简单或对样品更友好的采集中虚拟恢复具有生物学意义的信息 [3, 5]。最终，深度学习算法能够将图像中的大量信息编码到潜在空间中，从而发现不同的生物行为。

现有的深度学习用户友好型软件通常针对通用深度学习图像分析工作流程中的某个特定步骤。例如，ZeroCostDL4Mic 使训练过程以及多种神经网络架构的评估更加普及。它利用免费的云计算平台 Google Collaboratory，支持完成图1A中的大多数步骤。ImJoy [18] 提出了一个框架，无需进行任何技术安装步骤，即可直接在浏览器中与超越深度学习的线上内容交互。这是迈向云计算的一大步。Ilastik 是使用机器学习进行图像分割的参考工具，如今也能运行深度学习训练的模型。对于 ImageJ，我们发现了一些第三方插件，主要用于预测，包括 DeepClass4Bio [9], CSBDeep [3], StarDist [4] 和 deepImageJ [10]。后者使 BioImage Model Zoo 中训练模型的通用应用成为可能。

随着新型基于人工智能的方法不断发展，对更强大计算硬件的需求也日益增长。云计算或嵌入网络的基础设施对于确保显微成像领域转化技术的实现至关重要。共用基础设施或许是减少高能耗训练碳足迹的关键。欧洲基础设施 AI4Life

(https://www.eu-openscreen.eu/projects/ai4life.html) 旨在提供可持续、直观且质量最高的研究服务与基础设施，使所有生命科学家都能利用机器学习提升图像数据的实用性和可解释性。

**总结**

将深度学习整合到 ImageJ 中，是 DeepImageJ 所迈出的初步步骤，这对计算显微成像领域至关重要。要让所有人都能公平地使用强大的深度学习解决方案，就需要以友好的方式（甚至实现零代码）访问深度学习工具。通过开放获取预训练模型及相关数据，用户可以对其进行测试，并了解这项新技术的潜力与局限性。BioImage Model Zoo 等由社区推动的开发项目，正扩大深度学习在用于分析显微图像的开源软件中的应用范围。BioImage Model Zoo 背后的倡议正在推动解决上一节所述的挑战。具体而言，模型格式的标准化有助于实现不同平台之间的跨兼容性，并将促进稳健模型的推广。先进深度学习工具的可用性，使生命科学研究能够采用整体性方法。尤其是，技术进步先于生命科学研究的发展，并有助于实现突破性发现。总之，我们即将迎来显微成像领域的下一个“AlphaFold”。

**致谢**

我们感谢西班牙科学与创新部、西班牙国家研究局通过资助项目 *PID2019-109820RB-I00*、*MCIN/AEI/10.13039/501100011033/* 提供的支持。该项目由欧洲区域发展基金（*ERDF*）“建设欧洲之道”共同资助，并获得欧盟委员会地平线欧洲计划的支持（*AI4LIFE* 项目，资助协议 *101057970-AI4LIFE*）。*E.G.M.* 获得了古尔本基安基金会和欧洲分子生物学组织（*EMBO*）的安装资助（*EMBO-2020-IG-4734*）（授予古尔本基安科学研究所的光学细胞生物学实验室）以及博士后奖学金（*EMBO ALTF 174-2022*）的支持。

**参考文献**

1. E. Meijering, 《生物图像分析中的深度学习纵览》, 《计算与结构生物技术杂志》 **18**, 2312–232, 2020年。 2. J.C. Caicedo 等, 《成像实验中的细胞核分割：2018年数据科学竞赛》, 《自然·方法》 **16**, 1247–1253, 2019年。 3. M. Weigert 等, 《内容感知图像复原：突破荧光显微镜成像的极限》, 《自然·方法》 **15**, 1090–1097, 2019年。 4. U. Schmidt 等, 《利用星凸多边形进行细胞检测》, 载于国际医学图像计算与计算机辅助干预会议（*MICCAI*）, Springer 尚, 265–273, 2018年。 5. A. Speiser 等, 《深度学习实现快速、全连接层且高精度的单分子定位》, 《自然·方法》 **18**, 1082–1090, 2021年。 6. C.A. Schneider、W.S. Rasband 和 K.W. Eliceiri, 《从 NIH Image 到 ImageJ：图像分析的 25 年》, 《自然·方法》 **9**, 671–675, 2012 年。 7. F. de Chaumont 等, 《Icy：一个支持扩展、可复现研究的开源生物图像信息学平台》, 《自然·方法》 **9**, 690–696, 2012年。 8. P. Bankhead 等, 《QuPath：用于数字病理学图像分析的开源软件》, 载于*Scientific Reports* **7**, 16878, 2017年。

9. A. Inés 等，《DeepClas4Bio：将生物成像工具与用于图像分类的深度学习框架相连接》，《生物与医学中的计算机》 **108**，49–56，2019年。 10. E. Gómez-de-Mariscal 等，《DeepImageJ：在 ImageJ 中运行深度学习模型的用户友好环境》，《自然·方法》 **18**，1192–1195，2021年。 11. D. Ershov 等，《TrackMate 7：将最先进水平的分割算法集成到跟踪流程中》，《自然·方法》 **19**，829–832，2022年。 12. W. Ouyang 等，《BioImage Model Zoo：由社区推动、让深度学习在生物图像分析中更易获取的资源》，载于*bioRxiv*，2022年。 13. S. Berg 等，《ilastik：用于生物图像分析的交互式机器学习》，《自然·方法》 **16**，1226–1232，2019年。 14. W. Ouyang 等，《ImJoy：面向深度学习时代的开源计算平台》，《自然·方法》 **16**，1199–1200，2019年。 15. L. von Chamier 等，《借助 ZeroCostDL4Mic 推动显微镜成像领域深度学习的普及》，《自然·通讯》 **12**，1–18，2021年。

# 36 — 激发创新的黑客马拉松

Ebba Josefson Lindqvist[1], Johanna Bergman[1]
1. AI Sweden，瑞典哥德堡

## 现状

研究与创新并非孤立发生。随着人工智能成为几乎所有产业的关键技术，组织身处生态系统之中并积极参与其中正变得愈发重要[1]。很少有组织具备大规模全面应用机器学习所需的所有能力、数据和基础设施。要应对现实世界中的研究与创新挑战，既需要丰富的领域知识，也需要机器学习专业知识。黑客马拉松是解决这一问题、促进合作的一种方式。

机器学习社区长期以来有举办黑客马拉松和竞赛的传统[2]。目前有多个平台，其中最知名的是 Kaggle 和 Codalab[3,4]。黑客马拉松传统上聚焦于机器学习领域的某个特定问题，或围绕某个数据集进行问题定义。AI Sweden，即瑞典国家应用人工智能中心，曾举办多场黑客马拉松，聚焦于行业数据和行业合作伙伴提出的问题定义[5]。成功的关键因素包括：产业界高层管理者的承诺、清晰的问题定义、与领域专家的密切合作、易于获取的数据、定义明确的评估指标，以及获取所需计算资源的途径。

显微镜成像领域的一个近期案例是与阿斯利康联合举办的脂肪细胞成像挑战赛。问题定义和数据由阿斯利康的领域专家提供。AI Sweden 邀请研究人员和人工智能专家，提供协作平台、数据访问权限和计算基础设施。参赛者的任务是利用机器学习，根据相应的明场图像预测荧光图像的内容 [6] （示例图像见图1）。这场黑客马拉松取得的成果促成了新的产学合作和出版物 [7], ，更重要的是，产生了可由阿斯利康直接应用、从而助力其研究的解决方案。

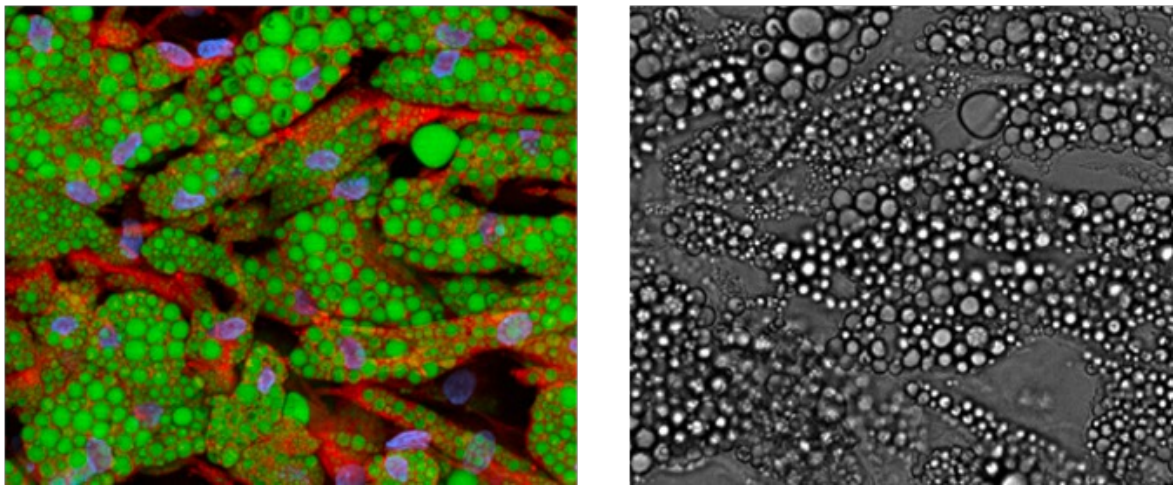

**图 36.1　脂肪细胞成像挑战赛。** 由 AI Sweden 和 AstraZeneca 于 2021年举办。

## 当前与未来的挑战

要让开放式黑客马拉松更有助于将机器学习应用于显微镜成像，还需要应对若干挑战。具体如下：

### 数据访问

获取数据是开发显微镜成像机器学习应用的关键。在许多情况下，所需数据由产业界收集。这类数据很少向学术研究人员、初创企业或其他公司开放。同时，这些组织通常拥有所需的大量机器学习专业能力，但仍可能无法使用所有必要资源，充分发挥所收集数据的潜力。

行业数据不共享的主要原因包括：传统观念认为数据属于专有资产，价值过高，不宜公开共享；毕竟，收集数据通常需要投入大量资金。共享数据也会引发一些问题，例如法律问题、数据商业模式的不确定性，以及如何评估数据的价值。法律方面的考量可能涉及知识产权、《通用数据保护条例》（GDPR），以及应采用何种版权许可。一般而言，数据集的使用越开放，越有利于推动研究取得新进展。开放数据集的访问权限，也可能是实现机器学习和显微镜成像领域出版物发表并接受同行评审的关键。这需要许多产业界参与者转变观念，采取开放创新的新思维。

### 领域知识与跨学科研究

要理解数据、定义问题并解读结果，需要广泛的领域知识。在黑客马拉松期间，获取领域知识并有机会在跨职能团队中协作至关重要。从脂肪细胞成像挑战赛中，我们可以看到，具备跨学科专业知识的团队表现优于仅由机器学习领域成员组成的团队。尽管所有团队都有机会每天与阿斯利康的领域专家交流，情况依然如此。

传统上，制药公司对研究往往采取相对长期的视角，并且非常重视内部资源以及既有的学术研究合作。

应用机器学习研究的趋势正朝着两个方向分化。一个方向是尽可能开放，依靠强有力的社区协作、合作以及基层研究倡议，数据、代码和模型通常会公开共享，开源则是默认选项。另一方面，许多进展出现在资源雄厚的大公司中；在这种情况下，模型和数据通常不会共享。这两个方向的共同点是都需要快速推进并投入大量资源（包括研究人员、数据和计算资源）。

自然地，涉及大量数据收集或甚至物理实验（例如显微镜成像）的研究，其时间跨度会更长。随着机器学习成为其他研究领域的重要组成部分，并有可能带来颠覆性进展，我们需要关注不同的传统、趋势和时间视角。

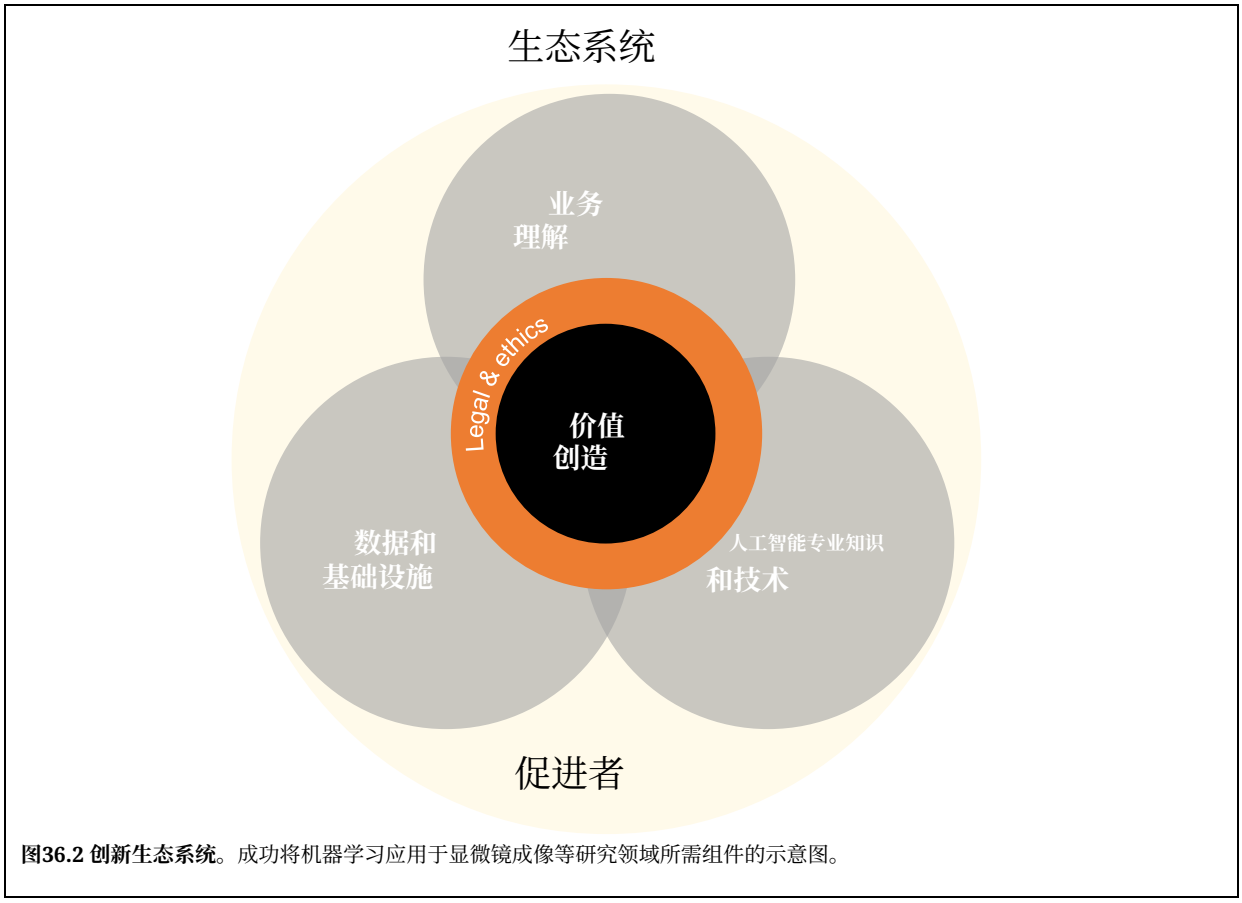


**图36.2 创新生态系统**。成功将机器学习应用于显微镜成像等研究领域所需组件的示意图。

**应对挑战的科学技术进展**

我们认为，在机器学习与显微镜研究的交叉领域，进一步通过黑客马拉松和竞赛获益的进展主要有两个方面，尤其是促进产业界、初创企业、学术界以及更广泛的机器学习社区之间的协作。

### 数据共享与数据商业模式

行业数据共享面临诸多挑战。根据我们的经验，黑客马拉松本身的组织过程会促使参与各方务实地解决数据访问问题，包括技术和法律视角下的问题；而在其他项目中，这一过程往往耗时很长。采用不同且更加开放的方式开展这一过程，有望加速制定数据共享的新最佳实践。

除了数据访问之外，我们还认为亟须制定商业模式和法律框架，以便共享数据和代码，从而使黑客马拉松和竞赛产生持久影响。同样重要的是，要改变将数据视为专有资产的观念，并认识到更开放地共享数据的价值。

### 社区建设与跨学科研究

要让黑客马拉松取得成功，建立强大的社区和协作平台至关重要。汇聚来自不同学科和组织的研究人员，建立强大的社区，将有助于推动研究领域的发展，以及显微镜成像机器学习应用的发展。举办黑客马拉松或许是建立此类社区的一种方式。

**总结**

总而言之，我们认为，黑客马拉松有望进一步推动显微镜研究领域与机器学习的融合，并以此探索新的合作、方法和工作方式。此外，我们也看到围绕显微镜成像和机器学习建立强大研究社区的机会。要促成此类社区的发展，需要协作平台、数据访问、法律框架以及围绕数据建立的商业模式。此外，将机器学习应用于其他领域的研究问题时，跨学科协作和扎实的领域专业知识是成功的关键。

应将较短的、由挑战赛驱动的竞赛或黑客马拉松视为探索并促成新的（有时出乎意料的）研究合作的一种方式，这些合作有望发展为持续的长期合作。这也可以成为应对并协调产业界与学术界不同时间观念和研究传统的一种途径，同时加速数据共享，并邀请更广泛的群体参与应用研究。

随着机器学习日益成为显微镜研究的重要工具，合作研究将愈发重要。根据脂肪细胞成像挑战赛的经验，黑客马拉松可以成为加快获取行业数据的一种助力，并推动显微镜机器学习研究所需合作关系的建立。AI Sweden 等中立组织，或专门的挑战赛平台（例如 Kaggle、Codalab），能够发挥促进作用，触达更广泛的群体。

**致谢**

我们特别感谢阿斯利康给予我们共同主办脂肪细胞成像挑战赛的机会，也感谢所有参赛团队。他们证明了黑客马拉松是建立新合作并加速应用研究的有力工具。

**参考文献**

1. N. Bozic Yams、V. Richardson、G. Esther Shubina、S. Albrecht 和 D. Gillblad，《集成式人工智能与创新管理：美好友谊的开端》，《技术创新管理评论》，第 5–18 页，2020年11月。 2. I. J. Goodfellow、D. Erhan、P. L. Carrier、A. Courville、M. Mirza、B. Hamner、W. Cukierski、Y. Tang、D. Thaler、X. Wang、D. Athanasakis、J. Shawe-Taylor、M. Milakov、J. Park、R. Ionescu 和 Popesc，《表征学习挑战：三场机器学习竞赛报告》，载于国际神经信息处理会议，2013年。 3. “Kaggle”，2022年。[在线]。网址：https://www.kaggle.com/。[访问日期：3月21日2022]。 4. “Codalab”，2022年。[在线]。网址：https://codalab.org/。[访问日期：3月21日2022]。 5. “AI Sweden”，[在线]。网址：https://www.ai.se/en。[访问日期：3月21日2022]。 6. “脂肪细胞成像挑战赛”，2020年。[在线]。网址：https://www.ai.se/en/challenge。[访问日期：3月21日2022]。 7. A. Dance，《人工智能发现人类无法识别的细胞结构》，施普林格·自然，第 592 卷，第 154–155 页，2021年4月1日。